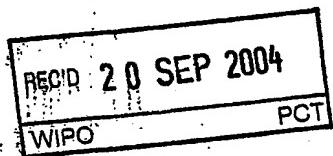




# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION



### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 16 AOÛT 2004

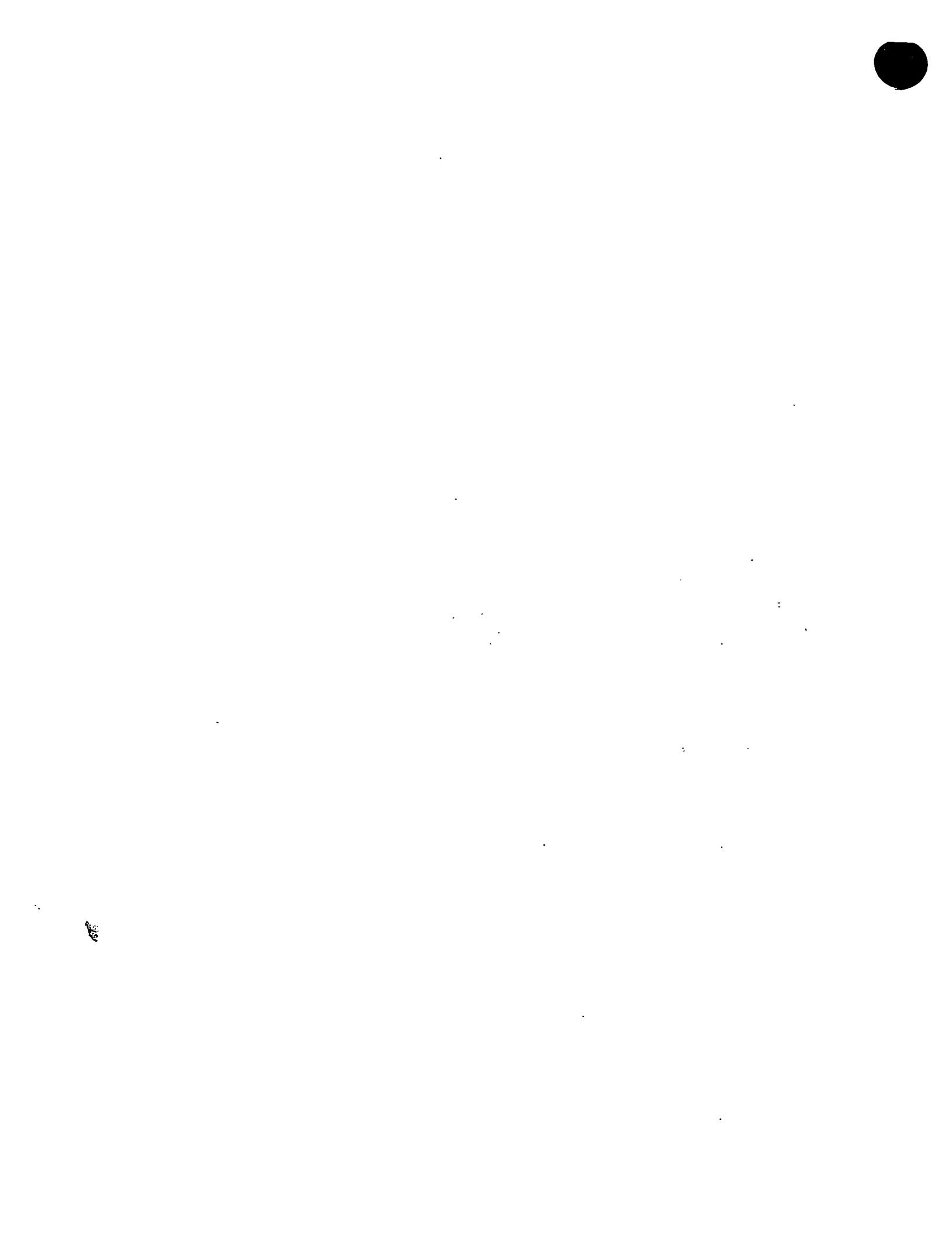
Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, enclosed in an oval shape.

Martine PLANCHE

### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)





INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

i bis, rue de Saint Pétersbourg  
7500 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354\*03

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
**page 1/2**

Cet Imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 210502

REMISE DES PIÈCES Réservé à l'INPI

DATE **25 JUIN 2003**

LIEU **75 INPI PARIS**

N° D'ENREGISTREMENT **0307694**

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE  
PAR L'INPI **25 JUIN 2003**

Vos références pour ce dossier **BFF 03P0282**

**10 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET LAVOIX**  
2, Place d'Estienne d'Orves  
75441 PARIS CEDEX 09

**Confirmation d'un dépôt par télécopie**

N° attribué par l'INPI à la télécopie

**2 NATURE DE LA DEMANDE**

**Cochez l'une des 4 cases suivantes**

Demande de brevet

Demande de certificat d'utilité

Demande divisionnaire

*Demande de brevet initiale*

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

page 2/2



REMISE DES PIÈCES

Réserve à l'INPI

DATE **25 JUIN 2003**

LIEU **75 INPI PARIS**

N° D'ENREGISTREMENT

**0307694**

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

**6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)**

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

**CABINET LAVOIX**

N ° de pouvoir permanent et/ou  
de lien contractuel

2 Place d'Estienne d'Orves

Adresse

Rue

Code postal et ville

**75441 PARIS CEDEX 09**

Pays

**FRANCE**

N° de téléphone (facultatif)

**01 53 20 14 20**

N° de télécopie (facultatif)

**01 48 74 54 56**

Adresse électronique (facultatif)

**brevets@cabinet-lavoix.com**

**7 INVENTEUR (S)**

**Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques**

Les demandeurs et les inventeurs  
sont les mêmes personnes

Oui

Non : **Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)**

**8 RAPPORT DE RECHERCHE**

**Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)**

Établissement immédiat  
ou établissement différé

Paiement échelonné de la redevance  
(en deux versements)

**Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt**

Oui

Non

**9 RÉDUCTION DU TAUX  
DES REDEVANCES**

**Uniquement pour les personnes physiques**

Requise pour la première fois pour cette invention (*joindre un avis de non-imposition*)

Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (*joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence*) : AG

**10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES  
ET/OU D'ACIDES AMINÉS**

Cochez la case si la description contient une liste de séquences

Le support électronique de données est joint

La déclaration de conformité de la liste de  
séquences sur support papier avec le  
support électronique de données est jointe

**Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,  
indiquez le nombre de pages jointes**

C. JACOBSON  
n° 92.1119

**VISA DE LA PRÉFECTURE  
OU DE L'INPI**

*Mme BLANCANEAU*

L'invention concerne des nouveaux composés utiles pour le diagnostic de nombreuses pathologies, notamment cardiovasculaires, cancéreuses, inflammatoires, et des compositions pharmaceutiques comprenant ces composés. Ces composés comprennent une partie de ciblage d'une zone pathologique, reliée à une partie de détection efficace sur le plan diagnostique. La partie de détection est typiquement un agent de contraste IRM, un agent de contraste aux rayons X, une entité contenant un radioisotope, ou étant détectable par ultrasons, ou par imagerie optique.

L'administration de produits de contraste à des patients contribue à améliorer la résolution des images obtenues et la précision du diagnostic. L'homme du métier connaît ainsi pour l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) un grand nombre de produits de contraste, dits non spécifiques, à base de chélates de Gadolinium, linéaires ou macrocycliques, décrits notamment dans les documents EP 71 564, EP 448 191, WO 02/48119, US 6 399 043, WO 01/51095, EP 203 962, EP 292 689, EP 425 571, EP 230 893, EP 405 704, EP 290 047, US 6 123 920, EP 292 689, EP 230 893, 15 US2002/0090342, US 6 403 055, WO 02/40060, US 6 458 337, US 6 264 914, US 6 221 334, WO 95/31444, US 5 573 752, US 5 358 704, US 2002/0127181, par exemple les composés DTPA, DTPA BMA, DTPA BOPTA, DO3A, TETA, TRITA, HETA, DOTA-NHS, TETA-NHS, DOTA (Gly)<sub>3</sub>-L-(p-isothiocyanato)-Phe-amide, DOTA, M4DOTA, M4DO3A, M4DOTMA, MPDO3A, HBED, EHPG, BFCs(US 6 517 814), des composés 20 de type polypodes. De tels chélates sont également dans certains cas utilisés en tant que produits thérapeutiques, sous forme de produits radiopharmaceutiques.

Il est toutefois apparu le besoin de développer une imagerie et un traitement dits spécifiques, le produit de contraste diagnostique ou le produit thérapeutique étant destinés à cibler des marqueurs biologiques associés de manière beaucoup plus précise à des pathologies déterminées. Plusieurs domaines thérapeutiques sont concernés, notamment les maladies cardiovasculaires, cancéreuses, inflammatoires. On entend ainsi dans le texte par produit spécifique un produit qui est capable de cibler spécifiquement un marqueur biologique associé à une ou plusieurs pathologies, par opposition à un produit non spécifique, sans ciblage de marqueur biologique, qui pourra dans certains cas donner un signal dans une zone pathologique mais qui donnera également ce signal dans une zone non pathologique et donc ne permettra pas de délimiter précisément la zone pathologique (pour une ablation optimale par exemple dans le cas d'une tumeur).

Concernant le domaine cardiovasculaire et la plaque d'athérome à risque, en terme de santé publique, les pathologies de la paroi vasculaire et leurs conséquences ont une incidence croissante dans la population. Il apparaît particulièrement crucial que les techniques d'imagerie permettent d'une part le diagnostic précoce et un dépistage des zones à risque et d'autre part l'évaluation de l'efficacité d'un traitement et le suivi thérapeutique. Actuellement, plus d'un tiers des infarctus du myocarde surviennent chez des patients asymptomatiques et il existe une attente forte pour prédire le risque d'accident vasculaire cérébral et myocardique chez des patients athéromateux. Il est maintenant admis, que la recherche de sténose (imagerie anatomique) n'est pas prédictive de ce risque et que l'enjeu diagnostique et pronostique est d'évaluer l'état fonctionnel de la plaque d'athérome. La disponibilité de produits permettant une méthode d'évaluation prédictive de la plaque d'athérome pour caractériser la paroi, discriminer les constituants et évaluer les risques de rupture permet ainsi une prévention ciblée du patient à risque.

Concernant le domaine oncologie, l'incidence des cancers est forte avec 10 millions de nouveaux cas diagnostiqués dans le monde en 1998, et elle continue d'augmenter du fait du vieillissement de la population. Au niveau mondial, 20 millions de nouveaux cas sont prévus en 2020 sur 8 milliards de personnes. Le cancer est la troisième cause de mortalité après les maladies cardio-vasculaires et infectieuses (et la deuxième cause dans les pays développés). Aujourd'hui, les tests d'imagerie disponibles dans le domaine du cancer permettent principalement la détection de masses suspectes et ne donnent pas d'information sur la nature cancéreuse ou non de celles-ci.

Une imagerie dite spécifique de zones pathologiques peut se faire par IRM, rayons X, scintigraphie aux rayons gamma, scanner CT, ultrasons, PET, imagerie optique. Dans le cas de l'IRM, un contraste est obtenu grâce à l'administration d'agents de contraste contenant des métaux paramagnétiques ou superparamagnétiques qui ont un effet sur la relaxivité des protons de l'eau. Dans le cas de la scintigraphie, le contraste est obtenu par la localisation spécifique d'un composé radiopharmaceutique émettant des rayons gamma ou beta.

La liaison de produits de contraste ou de produits radiopharmaceutiques à des marqueurs biologiques permet de cibler de manière spécifique des zones pathologiques. Ces molécules biologiques constituent des biovecteurs du produit de contraste ou du produit radiopharmaceutique, capables de cibler des marqueurs

associés à ces zones pathologiques, d'où l'expression imagerie spécifique. Les biovecteurs appropriés peuvent être, selon le type et l'état de la pathologie, des macromolécules telles que des anticorps ou des petites molécules telles que des oligonucléotides, des peptides, des sucres ou des molécules organiques....

On connaît ainsi l'association de biovecteurs à un agent de contraste (agent de contraste IRM, agent de contraste en scintigraphie, agent de contraste en imagerie aux rayons X, agent de contraste ultrason, agent de contraste en imagerie optique), ou à un radioisotope thérapeutiquement efficace en radiothérapie (radioisotope émettant un rayonnement cytotoxique).

Pour les produits de contraste IRM et les composés radiopharmaceutiques, il est essentiel d'obtenir une stabilité suffisante du complexe chélate-métal pour éviter une toxicité des produits.

L'art antérieur mentionne ainsi l'association de chélates cités plus haut avec des biovecteurs de ciblage de nombreuses pathologies, notamment de maladies cardiovasculaires, cancéreuses, inflammatoires ou dégénératives.

Par exemple, les documents WO99/59640 et WO 02/085908 mentionnent l'association de dérivés ciblant des récepteurs aux folates avec des chélates de type DOTA ou DTPA. Le document WO 02/055111 décrit l'association de biovecteurs de ciblage de la vitronectine dont  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha v\beta 5$  avec des chélates de type DTPA. Le document WO 98 47541 décrit l'association de biovecteurs de type peptides RGD pour le ciblage de MMP avec des chélates de type DTPA. On connaît aussi l'association de biovecteurs phosphonates ou phosphinates à du GdDTPA ou un radionucléide (WO 02/062398), et des composés à squelette porphyrine tels que le Gd2(DTPA)4-TPP.

L'art antérieur décrit de manière très dominante l'association de nombreux biovecteurs à des chélates à relaxivité relativement faible, inférieure à 10 mMol<sup>-1</sup>Gd<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, en indiquant que les résultats obtenus en imagerie sont satisfaisants avec ce type de chélates.

C'est par exemple le cas des documents WO 01/97850, 6093,6157, US 6 372 194, WO 2001/9188, WO 01/77145, WO 02 26776, WO 99/40947, WO 02062810, WO 02/40060, WO 92/09701, US 6 537 520, US 6 524 554, US 6 489 333, US 6 511 648, US A 2002/0106325, WO01/97861, WO 01/98294, WO 01/60416, WO 01/60280, WO01/97861, WO 02/081497, WO 01/10450, US 6 261 535, US 5 707 605, WO

02/28441, WO 02/056670, US 6 410 695, US 6 391 280, US 6 491 893, US A 2002/0128553, WO 02/054088, WO 02/32292, WO 02/38546.

5 L'homme du métier n'était pas ainsi conduit à rechercher des modifications de la partie signal (le chélate), la partie biovecteur étant suffisamment performante pour le diagnostique, la partie signal étant en quelque sorte secondaire.

On rappelle que la relaxivité longitudinale  $r_1$  d'un produit de contraste paramagnétique donne la mesure de son efficacité magnétique et permet d'apprécier son influence sur le signal enregistré. En imagerie médicale IRM, les produits de contraste modifient le temps de relaxation des protons, et l'augmentation de la relaxivité 10 obtenue permet d'obtenir un signal plus élevé. Les chélates de gadolinium, utilisés en clinique humaine, tels que Magnevist®, Dotarem® ou Omniscan®, sont de faible masse moléculaire, ont des relaxivités molaires  $r_1$  par Gd inférieures à  $5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

En fait, plusieurs problèmes techniques ne sont pas résolus par ce type de composés spécifiques décrits dans l'art antérieur. Ces composés ne sont pas ou pas 15 assez satisfaisants pour obtenir les résultats souhaités dans des conditions physiologiques (in vivo) ou dans des conditions proches des conditions physiologiques (ex vivo), en raison d'un manque de signal et/ou d'un manque de spécificité, et/ou de problèmes de toxicité. De tels chélates ne permettent pas d'obtenir une relaxivité suffisante en imagerie dite T1. Or cette imagerie T1 est clairement la plus courante et la 20 plus recherchée par les praticiens ; elle correspond à une lecture par différence de contraste positif entre une zone normale et une zone pathologique : le signal visible est blanc au niveau de la zone pathologique, alors que la zone normale apparaît en gris.

Plus précisément :

- 25 1) La spécificité du produit de diagnostique ne permet pas de dégager de différences suffisamment significatives entre les zones saines et les zones pathologiques pour conclure la délimitation précise d'une zone pathologique par exemple d'une tumeur. L'affinité du produit avec sa cible par l'intermédiaire du biovecteur est insuffisante pour qu'une image pertinente sur le plan diagnostique soit obtenue.
- 30 2) La sensibilité du produit est insuffisante : le signal apporté par le produit est insuffisant pour une bonne imagerie.

Les inventeurs, comme cela sera décrit en détail dans les exemples, ont par exemple étudié comme témoins des produits associant de l'acide folique et un chélate de type DOTA. Certains résultats in vitro sur cellules KB indiquent un ciblage de cellules

cancéreuses, comme indiqué dans le document WO99/59640, mais les images IRM obtenues *in vivo* sont inexploitables par le praticien car le signal est insuffisant. De tels produits nécessiteraient pour être efficaces des doses très élevées avec des risques notables de toxicité, de saturation des récepteurs, d'effet pharmacologique (et donc d'effet secondaire).

3) Le produit donne un signal *a priori* spécifique mais son élimination est soit trop rapide ce qui complique le diagnostique, soit trop lente ce qui entraîne une toxicité.

4) Le produit de contraste spécifique ne permet pas de détecter la zone pathologique ou la zone à risque pathologique (plaqué d'athérome à risque, tumeur en croissance ...) à un stade suffisamment précoce pour un traitement en amont. Ceci est dû notamment au fait que le signal en imagerie *in vivo* est insuffisant pour détecter de petites zones inférieures à 5 mm.

5) Les paramètres d'imagerie à gérer par le praticien sont complexes lors du diagnostique *in vivo*. Par exemple, l'analyse de l'information risque de fluctuer fortement pour de faibles écarts de dose de produit de contraste administrée, ou en fonction du moment où s'effectue la lecture du signal par rapport à l'administration du produit, ce qui pose des problèmes d'organisation et de fiabilité du diagnostique et/ou du traitement.

6) Le produit de contraste ne permet pas une détection suffisamment ciblée et sélective d'une zone pathologique. C'est par exemple le cas pour les plaques vulnérables à risques à l'origine de thromboses ou d'athéroscléroses comme rappelé dans le document US 2002/0127181. On a ainsi développé de nombreuses techniques invasives ou non invasives pour suivre l'évolution de la pathologie, dont l'angiographie des coronaires, l'angioscopie intravasculaire, l'IRM intravasculaire. Par exemple l'angiographie peut sous-estimer le degré de sténose, l'angioscopie invasive ou l'IRM avec les produits de contraste actuels permettent de visualiser des plaques mais pas de distinguer des plaques stables de plaques à risques.

Quelques documents, beaucoup moins nombreux, tels que le brevet US 6 221

334, décrivent des composés associant des chélates à relaxivité plus élevée et des biovecteurs. Mais les composés réellement exemplifiés posent des problèmes complexes de fabrication notamment. Il s'agit de composés de type dendrimères, décrits dans Invest.Radiol, 35, 50-57,2000, et dont la relaxivité est  $r_1=9.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Gd}^{-1}$ .

La synthèse chimique de tels dendrimères avec des biovecteurs variés est en outre délicate.

5 Tous ces problèmes nécessitent d'améliorer encore la structure des produits de contraste, pour les rendre totalement efficaces, ce qui est loin d'être évident pour l'homme du métier. Preuve en est d'ailleurs de la quasi absence de produits IRM spécifiques en essais cliniques alors que le principe d'une association d'un biovecteur et d'un chélate paramagnétique est énoncé depuis plusieurs années et a donné lieu à de nombreuses études.

10

L'invention vise à pallier au moins en partie les inconvénients de l'art antérieur. Les inventeurs ont réussi à obtenir des composés nouveaux en optimisant, d'une part la partie signal (contrastophore) en utilisant des dérivés de forte relaxivité (FR) appropriés de structure très éloignée des dendrimères, ce qui permet de limiter les problèmes de complexité de fabrication et d'impuretés, les problèmes de spécificité et de toxicité due à des doses élevées de biovecteurs, les problèmes de signal insuffisant, et d'autre part la partie biovecteur en utilisant des biovecteurs dont l'affinité pour les ligands cibles soit suffisante pour obtenir une biodistribution sélective capable de différencier les zones pathologiques.

20 En particulier, les produits obtenus ont une très bonne relaxivité molaire  $r_1$  aux champs magnétiques couramment utilisés, jusqu'à présent non obtenue pour des produits spécifiques. L'efficacité molaire ( $r_1$  par Gd) est d'au moins  $25 \text{ à } 40 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  pour les dérivés monométalliques décrits plus loin (DOTA FR et PCTA FR notamment) et peut atteindre des valeurs de  $120 \text{ à } 160 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  pour les dérivés polymétalliques décrits plus loin, voire davantage de l'ordre de  $200 \text{ à } 300 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , comparés à de l'ordre de  $5 \text{ à } 9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  avec la plupart des dérivés de l'art antérieur. On rappelle que l'obtention d'un signal important grâce à une haute relaxivité permet une meilleure résolution spatiale.

30 Autrement dit, la dose de biovecteur requise pour obtenir un même signal est réduite d'autant, ce qui permet de limiter très fortement la dose de biovecteur utilisée, donc les risques de toxicité et d'effets secondaires engendrés par certains biovecteurs ainsi que le coût de fabrication, et d'éviter d'utiliser des biovecteurs très complexes. Pour une même quantité de Gd injectée à un patient, les composés obtenus par les inventeurs requièrent une dose de l'ordre de 10 à 100 fois plus faible de biovecteur.

Par rapport à des produits spécifiques avec dendrimères ( $r_1=9mM-1s-1Gd-1$ ) sur lesquels sont greffés une trentaine d'atomes de Gd, les composés obtenus par les inventeurs ( $r_1=25$  à  $40$   $mM-1s-1Gd-1$ ) permettent d'utiliser pour obtenir une même relaxivité (donc un même signal) une dose de Gd réduite d'un facteur 3 à 4, ce qui est un avantage très important dans le domaine de l'imagerie.

Ces résultats sont d'autant plus avantageux qu'ils sont obtenus en utilisant une "plateforme" chimique (le contrastophore) permettant de recevoir des biovecteurs très variés.

D'autres avantages techniques sont cités plus loin dans la demande, et relèvent du large choix possible de biovecteurs et de la faible toxicité des produits obtenus.

Pour cela, le demandeur a utilisé des chélates à forte relaxivité, désignés FR, qui ont été décrits en partie par la demanderesse dans les brevets délivrés EP B 661 279, EP B 922 700, EP B 1 183 255, pour obtenir une relaxivité satisfaisante (pour un signal suffisant). Ces composés FR sont des chélates, capables de former des complexes du gadolinium paramagnétique dans le cas de l'IRM, comportant un macrocycle azoté porteur sur les atomes d'azote de groupes acétiques caractérisés par la présence, sur l'atome de carbone en alpha du carboxyle, de groupes hydrophiles.

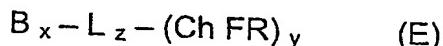
Cette association d'au moins un biovecteur avec au moins un composé chélate FR par l'intermédiaire d'au moins un lien L, a nécessité de surmonter, non seulement des problèmes techniques liés au diagnostic et à la biocompatibilité évoqués plus haut, mais aussi des problèmes techniques liés à la structure chimique des produits et décrits plus loin pour les différentes classes de biovecteurs développés.

En outre, les inventeurs sont allés à l'encontre du préjugé technique selon lequel il est préférable d'utiliser des molécules de taille limitée pour des produits spécifiques d'imagerie médicale. En effet, ils ont pu constater que l'encombrement des chélates FR utilisés n'altère pas l'affinité du produit spécifique pour sa cible. Malgré un poids moléculaire de l'ordre de 8 à 20 KD le produit parvient efficacement à son site de ciblage spécifique.

Dans tout le texte, on notera indifféremment ces composés  $(BIOV рЕCTEUR)_x-L_z-(CHELATE FR)_y$  ou BIOV рЕCTEUR-FR par souci de simplicité. CHELATE FR est remplacable par l'abréviation Ch FR.

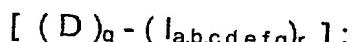
L'invention concerne donc selon un premier aspect des composés de formule générale suivante (E) :

(1)



5 dans laquelle :

- B est un biovecteur
- L est un lien
- Ch FR représente un chélate de formule (I) :

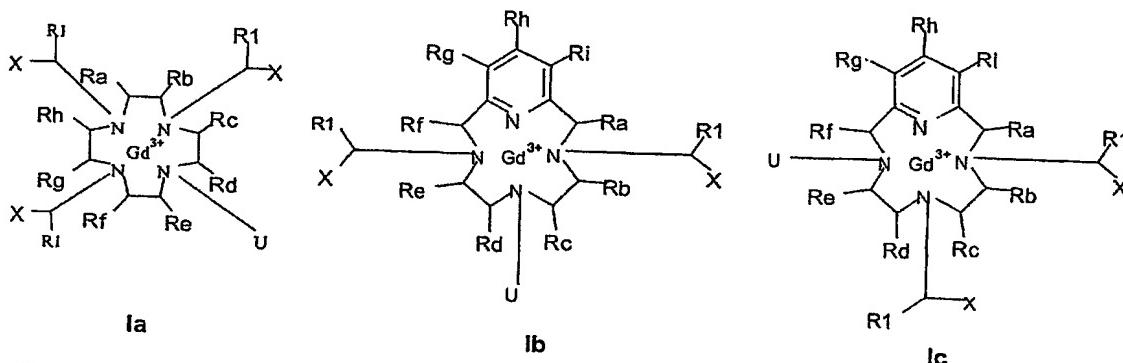


10

Avec :

a)  $I_{a,b,c,d,e,f,g}$  choisi parmi  $I_a, I_b, I_c, I_d, I_e, I_f, I_g$ ,

$I_a, I_b, I_c$  ayant les significations :



15

où :

- les X, identiques ou différents, sont choisis parmi  $CO_2R'_a, CONR'_bR'_c$  ou  $P(R'_d)O_2H$ , avec :

$R'_a, R'_b, R'_c$  identiques ou différents représentant H ou (C1-C8) alkyle, éventuellement hydroxylé ;

20

P est l'atome de phosphore,  $R'_d$  est choisi parmi OH, (C1-C8) alkyle ou (C1-C8) alkoxy, (C1-C8) arylalkyle ou (C1-C8) alkoxyalkyle ;

25

- $R_1$  représente un groupe hydrophile, typiquement de poids moléculaire (masse molaire en g/mol) supérieur à 200, de préférence de poids moléculaire supérieur à 300, plus préférentiellement supérieur à 500, encore de préférence supérieur à 800, et mieux encore supérieur à 1000, comprenant au moins trois atomes d'oxygène, sélectionné parmi des groupes :

-polyoxy (C2-C3) alkylène (i.e polyoxyéthylènes et polyoxypropylènes), notamment le polyéthylène glycol et ses monoéthers et monoesters en C1 à C3, de masse moléculaire de préférence de 1000 à 2000

- Polyhydroxyalkyle

5 - Polyol (dont oligosaccharides fonctionnalisés [ce type de fonctionnalisation étant décrit notamment dans J. Polymer. Sc. Part A Polymer chemistry 23 1395-1405 (1985) et 29, 1271-1279 (1991) et dans Bioconjugate chem. 3, 154-159 (1992)])

10 -  $(R_2 g)_e [ (R_2 g)_i R_3]_h$  où :

-  $h = 1$  ou  $2$  ;  $i = 0, 1$  ou  $2$  ;  $e = 1$  à  $5$

-  $R_2$  représente (les  $R_2$  étant identiques ou différents) :

- rien, un alkylène, un alkoxyalkylène, un polyalkoxyalkylène ;

- un phényle, ou un reste hétérocyclique saturé ou non, éventuellement substitué par OH, Cl, Br, I, (C1-C8)alkyle, (C1-C8)alkyloxy, NO<sub>2</sub>, NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, NR<sub>x</sub>COR<sub>y</sub>, CONR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, COOR<sub>x</sub>, R<sub>x</sub> et R<sub>y</sub> étant H ou (C1-C8)alkyle, et les groupes alkyle, alkylène, alkoxy, en C1 à C14 linéaires, ramifiés ou cycliques pouvant être hydroxylés ;

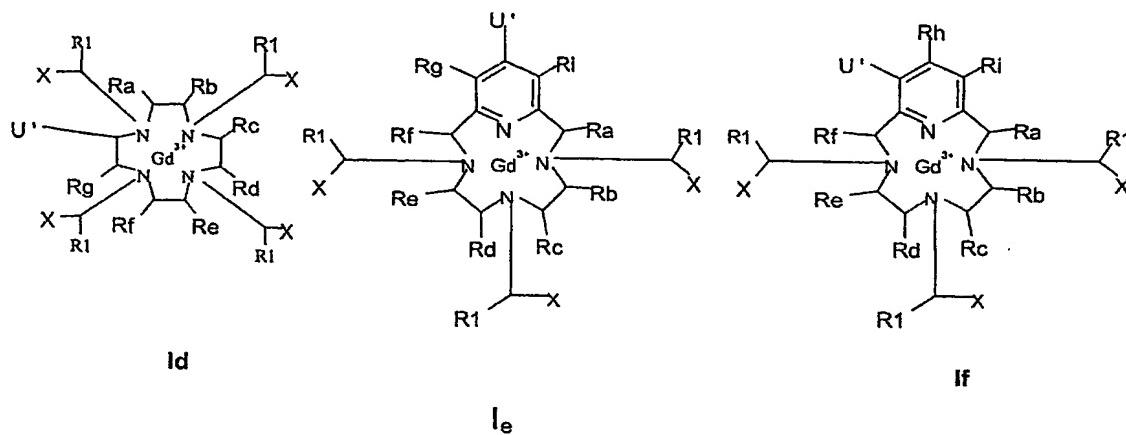
20 - g représente (les g étant identiques ou différents) : rien ou une fonction O, CO, OCO, COO, SO<sub>3</sub>, OSO<sub>2</sub>, CONR', NR'CO, NR'COO, OCONR', NR'CS, CSNR', SO<sub>2</sub>NR', NR'SO<sub>2</sub>, NR'CSO, OCSNR', NR'CSNR', P(O)(OH)NR', NR'P(O)-(OH), dans laquelle R' est H (C1-C8)alkyle ou R<sub>3</sub> ;

25 - R<sub>3</sub> représente alkyle, phényle, alkyle substitué ou interrompu par un ou des groupes phényles, alkylèneoxy; amino ou amido substitués ou non par alkyle éventuellement substitué ou interrompu par l'un des groupes précédents ; les groupes phényles, phénylènes et hétérocycliques pouvant être substitués par OH, Cl, Br, I, (C1-C8)alkyle, (C1-C8)alkyloxy, NO<sub>2</sub>, NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, NR<sub>x</sub>COR<sub>y</sub>, CONR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, COOR<sub>x</sub>, R<sub>x</sub> et R<sub>y</sub> étant H ou (C1-C8)alkyle, et les groupes alkyle, alkylène, alkoxy, en C1 à C14 linéaires, ramifiés ou cycliques pouvant être hydroxylés ;

30 - R<sub>a</sub> à R<sub>i</sub> (c'est à dire Ra, Rb, Rc, Rd, Re, Rf, Rg, Rh, Ri) représentent indépendamment H, alkyle, hydroxyalkyle, alkylphényle, cycloalkyle.

- U est un groupe -CXR4-lien 1, CHR4CON-lien1, CHR4-CHR5OH-lien1
- R4, R5 représentant indépendamment H, alkyle, hydroxyalkyle.
- X ayant la signification ci-dessus.
- 5 - Lien 1 étant le lien assurant le lien entre le chélate Ch FR et le lien L lorsque q=0 et entre le chélate Ch FR et D lorsque q=1

$I_d$ ,  $I_e$ ,  $I_f$  ayant les significations :



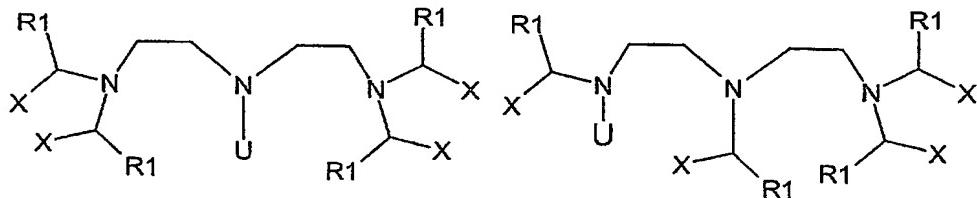
10

 $I_d$  $I_f$  $I_e$ 

15

- X,  $R_1$ ,  $R_a$  à  $R_i$  ayant la même signification que ci-dessus.
- $U'$  est lien 1.

-  $I_g$  représente



$U, X, R_1$  ayant la même signification que ci-dessus.

20

b)

- $q = 0$  ou  $q=1$
- $r=1$  lorsque  $q=0$ , ou  $r$  compris entre 2 et 5 lorsque  $q=1$

d) x, y et z sont compris entre 1 et 6, de préférence x=1 à 3, y=1 à 8, z=1 à 3 sachant que y=z.

Les liens L sont identiques ou différents entre eux, de même que les Ch FR.

5 (E), sous sa forme liée à un élément M, s'écrit  $B_x - L_z - (Ch\ FR - M)_y$  ; sachant que M est soit un radionucléide, typiquement choisi parmi  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{117}\text{Sn}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ;  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{149}\text{Pr}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ , soit un ion de métal paramagnétique de numéro atomique 21-29, 42-44, ou 58-70, soit un ion de métal lourd de numéro atomique 21-31, 39-49, 50, 56-80, 82, 83, 90.

10

L'invention concerne aussi les sels des composés de formule (E) avec des acides ou des bases minérales ou organiques, notamment les chlorhydrates des groupes amino et les sels de sodium, de potassium et de N-méthylglucamine des groupes acides carboxyliques présents sur les chélates.

15

Les groupements  $-CR_1X-$  constituent des branches hydrophiles greffées sur le cœur Gd. Avantageusement ces branches ont été choisies parmi :

- les branches désignées AAG1 AA28Br, AAG1 AA29Br décrites plus loin ;
- les branches décrites dans les documents EP 661 279, EP 922 700, EP 1 183 255 ;
- les branches dites flash décrites plus loin ;
- les branches dites à linker rigide  $CO - NH - \phi - CO - NH$ , dites P792, mentionnées plus loin.

20

De telles branches hydrophiles formant des bras latéraux sur les groupes acides peuvent être de nature différente et sont destinées à diminuer la liberté de mouvement du complexe paramagnétique et de l'ion paramagnétique qui lui y est attaché, dont la rotation dans le champ magnétique (fonction inverse de  $r^2$ ) est ainsi réduite d'où un phénomène d'immobilisation du complexe.

25

De plus, de manière assez surprenante, ces branches hydrophiles permettent de conserver l'affinité initiale du biovecteur. Cela semble dû à un effet de formation de réseau d'eau et de masquage des charges, l'interaction spécifique entre le biovecteur et son site cible n'étant pas altérée malgré la taille du chélate FR, taille qui aurait dissuadé l'homme du métier de le coupler à un biovecteur. En outre cette hydrophilie permet de résoudre les problèmes importants de manque de solubilité rencontrés avec les

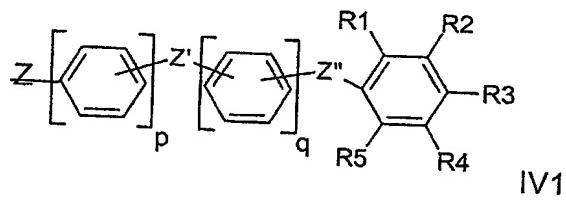
biovecteurs dans l'art antérieur. On a indiqué comme masse moléculaire au moins 200 pour les branches hydrophiles ; il est clair pour l'homme du métier qu'il peut être amené à varier autour de cette valeur tant que l'effet d'immobilisation des branches à l'origine de la forte relaxivité est atteint. Typiquement la masse moléculaire des branches est inférieure à 3000 pour éviter d'avoir des chaînes trop complexes à fabriquer, et pour obtenir une bonne efficacité massique par Gd.

Par ailleurs, la demanderesse fait les commentaires suivants :

- Pour U=CXR4-CHR5OH-lien 1 ou U=CHR4CON-lien1 , on facilite la synthèse.
- De manière préférée, X représente CO<sub>2</sub>R'<sub>a</sub> ; toutefois l'utilisation de CONR'b R'c permet d'obtenir des composés non ioniques intéressants pour diminuer l'osmolalité du produit, et l'utilisation de P(R'<sub>d</sub>)O<sub>2</sub>H peut permettre d'obtenir des produits à plus forte relaxivité.
- De manière préférée, Ra, Rb, Rc représentent H, mais on peut également utiliser des groupes alkyles ou cycloalkyles pour stabiliser la structure et améliorer la relaxivité, à condition de ne pas interférer avec les propriétés recherchées du produit (la rigidification par greffage de groupes alkyles est connue de l'homme du métier dans Inorganic Chemistry, vol 41, n°25, p6846-6855, 2002). Les groupes hydroxyalkyle sont connus de l'homme du métier pour diminuer la toxicité des structures, comme décrit dans Inorganic Chemical Acta 317, 2001, 218-229, et Coordination Chemistry Reviews, 185-186, 1999, 451-470.

Selon des réalisations non limitatives, on aura les composés (2) à (18) suivants :

(2) les composés (E) ci-dessus dans lesquels R1 est (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CONHR avec x=1, 2 ou 3 et R est un groupe hydrophile de poids moléculaire supérieur à 200, choisi parmi :  
1) un groupement :



et Z est une liaison, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CONH ou (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCO

$Z'$  est une liaison, O, S, NQ, CH<sub>2</sub>, CO, CONQ, NQCO, NQ-CONQ ou CONQCH<sub>2</sub>CONQ,

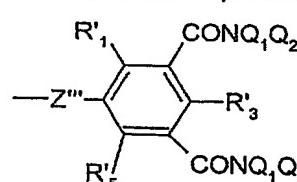
$Z''$  est une liaison, CONQ, NQCO ou CONQCH<sub>2</sub>CONQ

p et q sont des nombres entiers dont la somme vaut 0 à 3 ;

5 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> ou R<sub>5</sub> représentent :

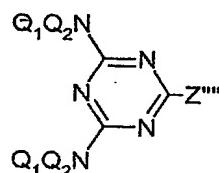
- soit indépendamment l'un de l'autre H, Br, Cl, I, CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> ou NQ<sub>1</sub>COQ<sub>2</sub> avec Q<sub>1</sub> et Q<sub>2</sub> identiques ou différents sont H ou un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alkyle mono- ou polyhydroxylé ou éventuellement interrompu par un ou des atomes d'oxygène, et au moins l'un et au plus deux des R<sub>1</sub> à R<sub>5</sub> sont CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> ou NQ<sub>1</sub>COQ<sub>2</sub> ;

- soit R<sub>2</sub> et R<sub>4</sub> représentent



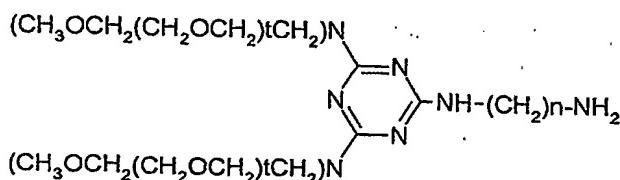
et R<sub>1</sub>, R'<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R'<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> et R'<sub>5</sub>, identiques ou différents, représentent H, Br, Cl ou I, Q<sub>1</sub> et Q<sub>2</sub> ont la même signification que précédemment et Z''' est un groupe choisi parmi CONQ, CONQCH<sub>2</sub>CONQ, CONQCH<sub>2</sub>, NQCONQ, CONQ(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NQCO et Q est H ou (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyle, éventuellement hydroxylé, les groupes alkyle pouvant être linéaires ou ramifiés ;

2) une branches dite "flash"

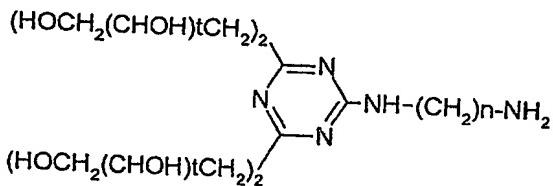


20 avec Z''' étant NQ(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>(CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>NH<sub>2</sub>, avec i = 2 à 6 et j = 1 à 6,

de préférence



ou



avec  $t = 1, 2, 3$  ou  $4$  et  $n=2$  à  $6$ .

(3) les composés (E) avec  $q=1$ .

- 5 Un ou plusieurs chélates FR du composé (E) comprennent ainsi un diviseur D. Différents diviseurs sont possibles, tant qu'ils permettent de faire le lien entre d'une part au moins deux chélates, et d'autre part le ou les liens  $L_z$ . Différents squelettes polyfonctionnels peuvent être utilisés par l'homme du métier comme diviseur, décrits notamment dans Chemical Reviews, 2001, 101 (12), 3819-386 et Topics in Current Chemistry, vol 217, 212, 210, 197. On préfère comme diviseur des squelettes aromatiques polyfonctionnalisés par des groupements carboxylates et/ou aminés.
- 10 On peut écrire D sous la forme ( $\text{Div} - \text{lien } 2$ ),  $\text{Div}$  étant un groupement ayant un nombre de valences libres au moins égal à  $r$ .  $D$  est lié d'une part à au moins deux chélates métalliques par l'intermédiaires de liens 1 cités précédemment, et d'autre part au lien L par l'intermédiaire d'un lien 2. On a par exemple pour  $r=2$
- 15 (lien 2) – Div – (lien 1)<sub>2</sub>;

(E) s'écrivant :

- 20 (BIOVÉCTEUR)<sub>x</sub> -  $L_z$  - [ (Lien 2 – Div )<sub>q</sub> - (  $I_{a,b,c,d,e,f,g}$ )<sub>r</sub> ]<sub>y</sub>  
les deux liens 1 étant inclus dans  $I_{a,b,c,d,e,f,g,h}$

- Contrairement au cas des dendrimères, les composés (E), notamment ceux avec un diviseur D, permettent d'obtenir :
- 25 - une séparation stérique de la partie signal et de la partie biovecteur  
- une liberté conformationnelle du biovecteur, qui n'étant pas précontraint conserve son affinité  
- un signal efficace avec un nombre de Gd limité  
- un contrôle de la pureté et de la polydispersité, alors que les produits de type dendrimères ont une pureté très faible inférieure à 5%  
30 - un nombre de Gd administré totalement contrôlé

- une hydrophilie de la partie contrastophore qui rend la partie inerte, favorisant ainsi la reconnaissance du biovecteur sur son site spécifique de liaison.

En outre :

- le schéma de construction des produits obtenus avec ou sans diviseur est modulaire, les propriétés physicochimiques de chaque module (B, L, Ch FR) de la structure pouvant être contrôlées, par exemple l'hydrophilie, la viscosité, la charge, ce qui permet de maîtriser en particulier la solubilité du produit, de limiter la quantité de produit à administrer.
- on évite, contrairement aux dendrimères, des effets non souhaités de fixation de molécules (cholestérol, ions, métaux endogènes, ...).

De plus, les produits obtenus semblent avoir l'avantage de présenter dans l'organisme une rémanence supérieure à celle de composés spécifiques de type DOTA non FR de l'art antérieur : la taille des produits obtenus diminue leur élimination notamment rénale en contribuant à augmenter le temps de contact dans l'organisme.

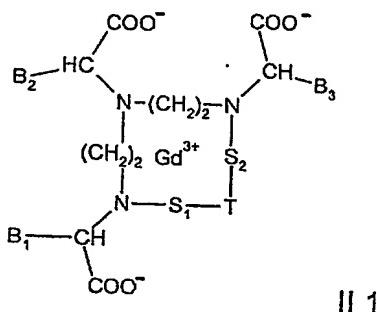
Cette structure avec diviseur (les composés sont alors appelés polymétalliques car porteurs de plusieurs chélates FR), est particulièrement avantageuse car elle permet d'obtenir encore une forte hausse de la relaxivité molaire, donc d'efficacité du produit pour une même dose de Gd administrée au patient. La relaxivité par chélate, de l'ordre de  $25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  pour les DOTA FR à  $40 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  pour les PCTA FR, est multipliée par le nombre de chélates de la structure. Autrement dit pour un biovecteur FR porteur de quatre chélates par exemple, la relaxivité est de l'ordre de 120 à 160. Cette structure peut permettre d'obtenir de très bons résultats même avec des biovecteurs pour lesquels les dérivés non FR ne sont pas assez efficaces en imagerie. Les biovecteurs polymétalliques portent typiquement de 2 à 8 chélates de gadolinium, voire davantage. On aura selon des réalisations préférées des composés avec l'architecture suivante :

- $x=y=z=1$  et  $q=1$  : biovecteur reliés par un lien L à un diviseur lié lui-même à deux chélates
- $x=1$ ,  $y=z=2$ , et  $q=1$  : biovecteur relié par deux liens L à deux diviseurs, chaque diviseur étant lié à deux chélates (donc 4 chélates au total)
- $x=1$ ,  $y=z=3$ , et  $q=1$  : biovecteur relié par trois liens L à trois diviseurs, chaque diviseur étant lié à deux chélates (donc 6 chélates au total).

On comprend en outre qu'un diviseur D peut lui-même comprendre en fait au moins deux sous diviseurs en arborescence. On aura par exemple le cas d'un biovecteur relié

par deux liens L à deux diviseurs, chaque diviseur comprenant deux sous-diviseurs et portant ainsi 4 chélates, le biovecteur polymétallique comportant au total 8 chélates.

(4) les composés de formule (E) avec Ch FR représentant un groupe choisi parmi :

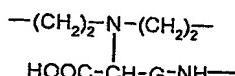


5

dans lequel :

-S<sub>1</sub>-T-S<sub>2</sub>- est

1) soit

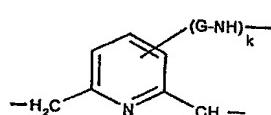


10

où S<sub>1</sub> = S<sub>2</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>

avec B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> représentant tous les trois (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CONHR avec x = 1, 2 ou 3

2) soit



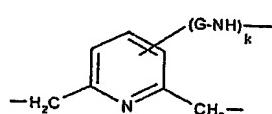
15

avec k = 0 et S<sub>1</sub> = S<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>

l'un des B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> représentant G-NH, et les autres représentant (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CONHR

20

3) soit



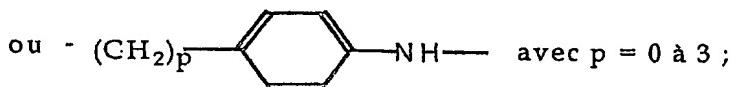
III 1

avec k=1

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> représentant tous les trois (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CONHR avec x = 1, 2 ou 3

et GNH choisi parmi :

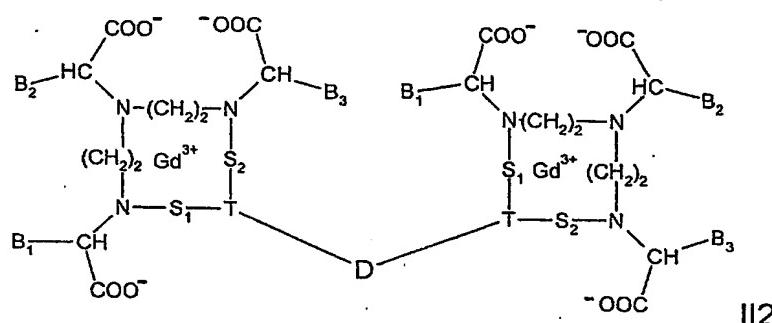
les groupes  $-(CH_2)_n-NH-$  avec  $n = 1 \text{ à } 4$ ,



5 G-NH représente lien 1 décrit plus haut dans ces composés.

(5) les composés de formule (E) avec Ch FR représentant un groupe choisi parmi:

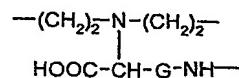
1) le groupe



10

dans lequel

$-S_1-T-S_2-$  est

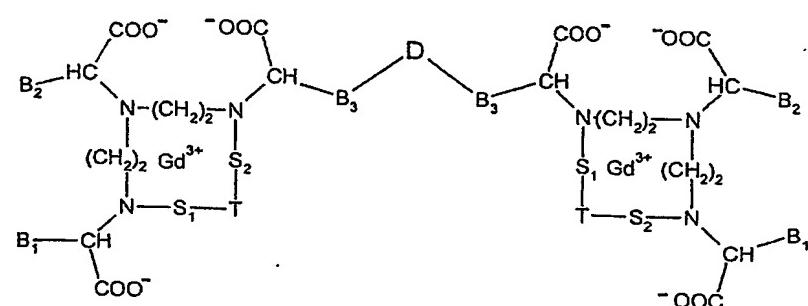


où  $S_1 = S_2 = (CH_2)_2$

15

$B_1, B_2, B_3$  représentant tous les trois  $(CH_2)_xCONHR$  avec  $x = 1, 2$  ou  $3$

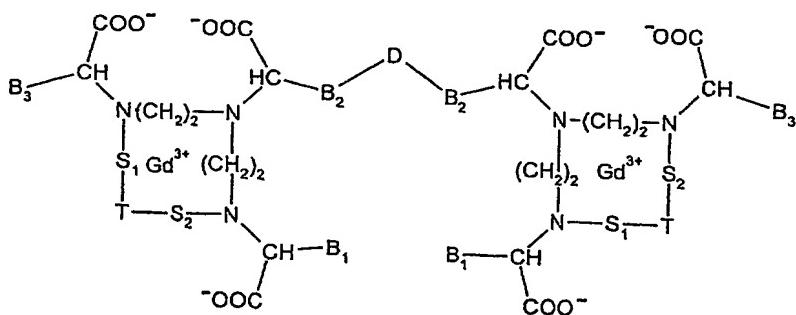
2) le groupe



IIa2 (composé dit PCTA N fonctionnalisé)

20

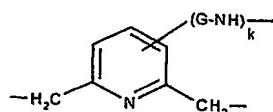
Ou IIb2 (composé dit PCTA N fonctionnalisé et isomère de position du IIb2)



5

II b2

Dans lesquels  $S_1-T-S_2-$  est :



III2

10

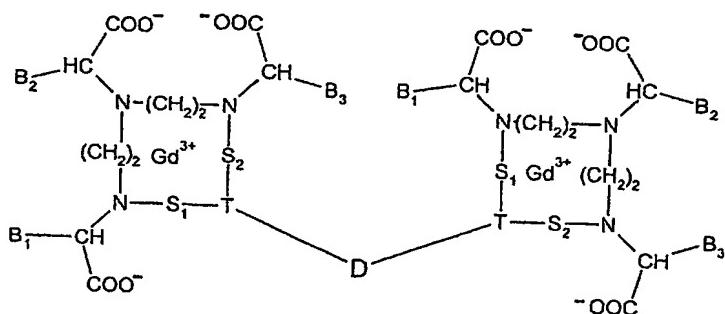
avec  $k = 0$  et  $S_1 = S_2 = CH_2$ ;

$B_3$  représentant  $G-NH$ , et  $B_1$  et  $B_2$  représentant  $(CH_2)_xCONHR$  pour IIa2

15

$B_2$  représentant  $G-NH$ , et  $B_1$  et  $B_3$  représentant  $(CH_2)_xCONHR$  pour II b2

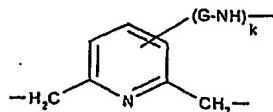
3) le groupe



20

IIc2 (composé dit PCTA C fonctionnalisé)

lorsque  $S_1-T-S_2-$  est :



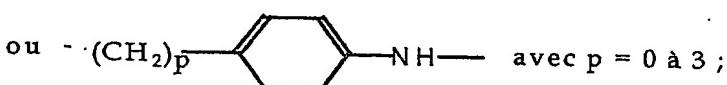
avec k = 1 et S<sub>1</sub> = S<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>;

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> représentant tous les trois (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CONHR avec x = 1, 2 ou 3 pour IIc2

5

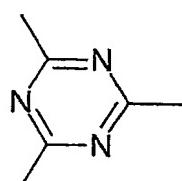
Sachant que, pour II2, IIa2, IIb2 et IIc2,

GNH est choisi parmi les groupes -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH- avec n = 1 à 4,



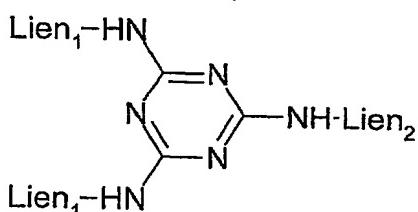
10

(6) les composés de formule (E) avec D étant un squelette aromatique polyfonctionnalisé par des groupements carboxylates et/ou aminés, de préférence Div étant de type 1,3,5 triazine, de formule :



15

avec (lien 1)<sub>2</sub> - Div - (lien 2) s'écrivant :



avec lien 1 et lien 2 étant choisis parmi a) et b) et de préférence a) :

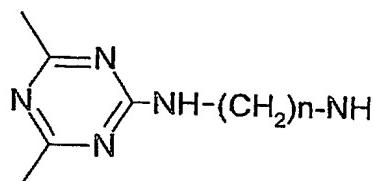
a) (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> - φ - NH , (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> - NH, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH, rien ou une simple liaison

20

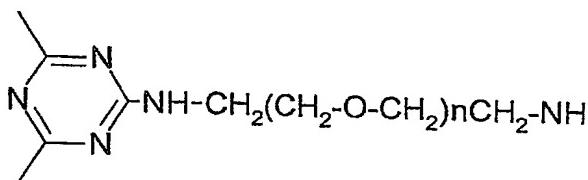
b) P<sub>1</sub>-I-P<sub>2</sub>, identiques ou différents, P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> étant choisis parmi O, S, NH, rien, CO<sub>2</sub>, NCS, NCO, SO<sub>3</sub>H, NHCO, CONH, NHCONH, NHCSNH, SO<sub>2</sub>NH-, NHSO<sub>2</sub><sup>-</sup>, squarate

Avec I = Alkylène, alkoxyalkylène, polyalkoxyalkylène, alkylène interrompu par phénylène, alkylidène, alcilidène, alcynylène,

D est par exemple selon une réalisation :



ou



5

- (7) les composés de formule (E) avec L un lien choisi parmi les polyoxyalkylènes, l'acide squarique, les assemblages PEG-squarate, un radical alkylène, alkoxyalkylène, polyalkoxyalkylène, alkylène interrompu par phénylène, alkylidène, alcilidène.
- 10 Un grand nombre de liens L peuvent être utilisés, dans la mesure où ils sont capables d'interagir avec au moins un groupe fonctionnel de biovecteur et au moins un groupe fonctionnel de chélate FR. On citera notamment :
- a.1  $(\text{CH}_2)_2 - \phi - \text{NH}$ ,  $(\text{CH}_2)_3 - \text{NH}$ ,  $\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}$ ,  $\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}$ , rien ou une simple liaison
- 15 a.2  $\text{P}_1-\text{I}-\text{P}_2$ , identiques ou différents,  $\text{P}_1$  et  $\text{P}_2$  étant choisis parmi O, S, NH, rien,  $\text{CO}_2$ , NCS, NCO,  $\text{SO}_3\text{H}$ , NHCO, CONH, NHCONH, NHCSNH,  $\text{SO}_2\text{NH}$ ,  $\text{HSO}_2^-$ , squarate
- Avec I = Alkylène, alkoxyalkylène, polyalkoxyalkylène, alkylène interrompu par phénylène, alkylidène, alcilidène
- b) des liens décrits dans le brevet US 6 264 914, capables de réagir avec les groupes fonctionnels (du biovecteur et du chélate) amino, hydroxyle, sulfhydryle, carboxyle, carbonyle, carbohydrates, thioéthers, 2-aminoalcohols, 2-aminothiols, guanidinyle, imidazolyle, phénolique.
- 25 Des groupements capables de réagir avec des groupes sulfhydryle incluent les composés alpha-haloacétyle du type  $\text{X}-\text{CH}_2\text{CO}-$  (où X=Br, Cl ou I), qui peuvent aussi être utilisés pour agir avec des groupes imidazolyle, thioéther, phénol, amino. Des groupements capables de réagir notamment avec des groupes amino incluent :

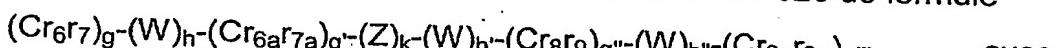
-des composés d'alkylation : composés alpha-haloacétyle, dérivés N-maleémide, composés aryle (nitrohaloaromatiques par exemple), aldéhydes et cétones capables de formation de bases de Schiff, des dérivés époxides tels que l'épichlorohydrine, des dérivés de triazines contenant de la chlorine très réactifs vis-à-vis de nucléophiles, des aziridines, des esters de l'acide squarique, des éthers alpha.-haloalkyle.

-des composés d'acylation : isocyanates et isothiocyanates, des chorures de sulfonyle, des esters tels que des nitrophenylesters ou des N-hydroxysuccinimidyl esters, des anhydrides d'acide, des acylazides, des azlactones, des imidoesters.

Des groupements capables de réagir avec des groupes carboxyle incluent des composés diazo (diazoacétate esters, diazoacétamides), des composés modifiant des acides carboxyliques (carbodiimides par exemple), des dérivés isoxazolium (nitrophenylchloroformate; carbonyldiimidazoles...), des dérivés quinoline.

Des groupements capables de réagir avec des groupes guanidinyle incluent des composés diones tels que le phénènediglyoxal, des sels diazonium.

c) certains liens décrits dans le brevet US 6 537 520 de formule



-  $g+h+g'+k+h'+g''+h''+g'''$  différent de 0;

- W choisi parmi O, S, NH, NHC(=O), C(=O)NH, C(=O), C(=O)O, OC(=O), NHC(=S)NH, NHC(=O)NH, SO<sub>2</sub>, (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s'</sub>, (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>s''</sub>, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>t</sub> ;

- Z choisi dans le groupe : aryle substitué par 0-3 r<sub>10</sub>, cycloalkyle C<sub>3</sub>-10 substitué par 0-3 r<sub>10</sub>, système hétérocycle de 5-10 membres contenant 1-4 hétéroatomes indépendamment choisis parmi N, S, O et substitué par 0-3 r<sub>10</sub> ;

- r<sub>6</sub>, r<sub>6a</sub>, r<sub>7</sub>, r<sub>7a</sub>, r<sub>8</sub>, r<sub>8a</sub>, r<sub>9</sub>, r<sub>9a</sub> indépendamment choisis parmi : H, =O, COOH, SO<sub>3</sub>H, PO<sub>3</sub>H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alkyle substitué par 0-3 r<sub>10</sub>, aryle substitué par 0-3 r<sub>10</sub>, benzyle substitué par 0-3 r<sub>10</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alkoxy substitué par 0-3 r<sub>10</sub>, NHC(=O)r<sub>11</sub>, C(=O)NH r<sub>11</sub>, NHC(=O)NH r<sub>11</sub>, NH r<sub>11</sub>, r<sub>11</sub>, et un lien avec Ch FR ;

- $r_{10}$  indépendamment choisi parmi : un lien à ChRR, COOr<sub>11</sub>, OH, NH r<sub>11</sub>, SO<sub>3</sub>H, PO<sub>3</sub>H, aryle substitué par 0-3 r<sub>11</sub>, C1-5 alkyle substitué par 0-1 r<sub>12</sub>, C1-5 alkoxy substitué par 0-1 r<sub>12</sub>, et un hétérocycle de 5-10 membres contenant 1-4 hétéroatomes indépendamment choisis parmi N, S, O et substitué par 0-3 r<sub>11</sub>;
- r<sub>11</sub> est indépendamment choisi parmi : H, aryle substitué par 0-1 r<sub>12</sub>, hétérocycle à 5-10 membres comprenant 1-4 hétéroatomes choisis parmi N, S, O et substitué par 0-1 r<sub>12</sub>, C3-10 cycloalkyle substitué par 0-1 r<sub>12</sub>, polyalkylène glycol substitué par 0-1 r<sub>12</sub>, carbohydrate substitué par 0-1 r<sub>12</sub>.
- r<sub>12</sub> est un lien avec Ch FR;
- avec k choisi parmi 0, 1, 2; h choisi parmi 0, 1, 2; h' choisi parmi 0, 1, 2, 3, 4, 5; h'' choisi parmi 0, 1, 2, 3, 4, 5; g choisi parmi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; g' choisi parmi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; g'' choisi parmi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; s choisi parmi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; s' choisi parmi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; s'' choisi parmi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; t choisi parmi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

d) certains liens décrits dans le document WO 02/085908, par exemple une chaîne linéaire ou ramifiée de linker choisis parmi :

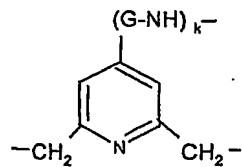
- CR<sub>6'''</sub>R<sub>7'''</sub>- , - (R<sub>6'''</sub>)C=C(R<sub>7'''</sub>)=, -CC-, -C(O)-, -O-, -S-, -SO<sub>2</sub>-, -N(R<sub>3'''</sub>)-, - (R<sub>6'''</sub>)C=N-, -C(S)-, -P(O)(OR<sub>3'''</sub>)-, -P(O)-(OR<sub>3'''</sub>)O-, avec R<sub>3'''</sub> un groupe capable de réagir avec un azote ou un oxygène
- Une région cyclique (cycloalkyles divalents, hétérocycliques divalents)
- Des polyalkylènes, polyalkylènes glycols

e) des liens décrits dans le document WO 02/094873.

Pour les liens lien 1 et lien 2, on utilisera typiquement une liaison chimique ou des liens du a).

(8) les composés selon (3) à (7) avec x de (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CONHR est x=2.

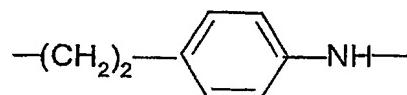
(9) les composés (4) à (8) dans lesquels -S<sub>1</sub> – T – S<sub>2</sub>- représente :



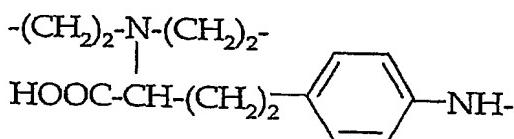
avec  $S_1 = S_2 = \text{CH}_2$ .

(10) les composés selon (9) de formule II.1 dans laquelle  $k$  est 1 et  $G$  est  $-(\text{CH}_2)_3-$ .

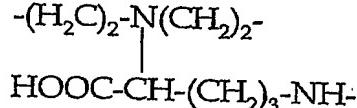
5 (11) les composés selon (9) de formule II.1 dans laquelle  $k$  est 0 et  $B_2$  ou  $B_3$  représente  $-(-\text{CH}_2)_3\text{NH}-$  ou



(12) les composés selon (4) à (12), dans lesquels  $-S_1-T-S_2-$  représente :



ou



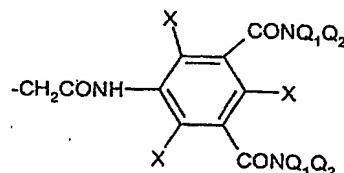
10

avec  $S_1 = S_2 = (\text{CH}_2)_2$ .

(13) les composés selon (4) à (9) pour lesquels  $B_1$ ,  $B_2$  et  $B_3$ , lorsqu'ils ne représentent pas  $-G-\text{NH}$ , représentent  $-(\text{CH}_2)_2\text{CONHR}$ , avec dans R,  $p = q = 0$  et Z étant  $-\text{CH}_2\text{CONH}$ .

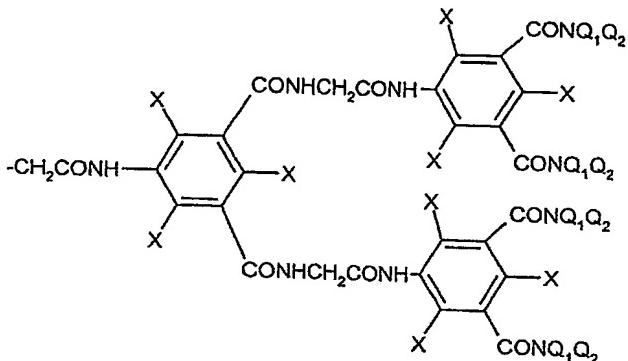
15

(14) les composés selon (13) pour lesquels R représente :



et les X sont identiques et représentent Br ou I tandis que Q<sub>1</sub> et Q<sub>2</sub>, identiques ou 20 différents, sont des groupes (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alkyle, mono- ou polyhydroxylés, de telle sorte que chaque CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> comporte de 4 à 10 hydroxyles au total.

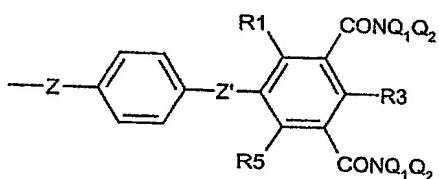
(15) les composés selon (13) pour lesquels R représente :



et les X identiques sont Br ou I et Q<sub>1</sub> et Q<sub>2</sub>, identiques ou différents, sont des groupes (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alkyle, mono ou polyhydroxylés de telle sorte que chaque groupe CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> comporte de 4 à 10 hydroxyles au total.

5

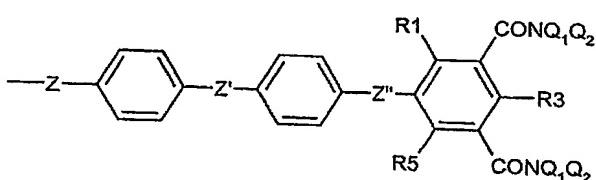
(16) les composés selon (1) à (12) pour lesquels R représente :



10 Z est CH<sub>2</sub> ou CH<sub>2</sub>CONH, Z' est CONH ou CONHCH<sub>2</sub>CONH, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, identiques, sont Br ou I, Q<sub>1</sub> et Q<sub>2</sub>, identiques ou différents, étant des groupes (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alkyle, mono ou polyhydroxylés, de telle sorte que chaque groupe CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> comporte de 4 à 10 hydroxyles au total.

15

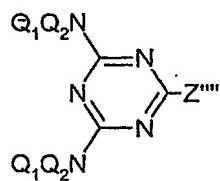
(17) les composés selon (1) à (12) pour lesquels R représente :



20

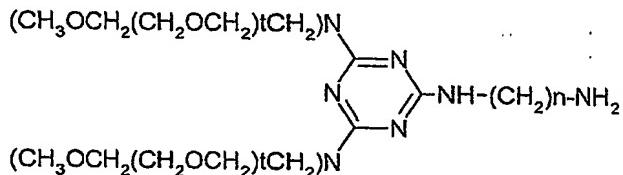
Z est CH<sub>2</sub>CONH, Z' est CONH, Z'' est CONHCH<sub>2</sub>CONH et R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> identiques sont Br ou I et Q<sub>1</sub> et Q<sub>2</sub>, identiques ou différents, sont des groupes (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alkyle, monohydroxylés ou polyhydroxylés, de telle sorte que chaque groupe CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> comporte de 4 à 10 hydroxyles au total.

(18) les composés selon (1) à (12) pour lesquels R représente



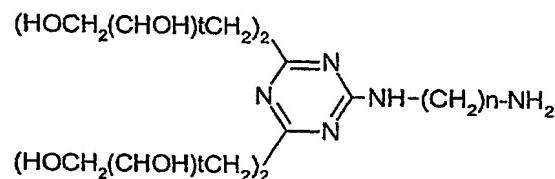
avec  $Z'''$  étant  $NQ(CH_2)_j(CH_2OCH_2)_i(CH_2)_jNH_2$ , avec  $i = 2$  à  $6$  et  $j = 1$  à  $6$ ,

de préférence



5

ou



avec  $t = 1, 2, 3$  ou  $4$  et  $n = 2$  à  $6$ .

10 On a notamment synthétisé les composés A1 suivants dans lesquels  $x$  et  $R$  ont les significations précédentes :

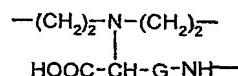
- ceux dans lesquels le macrocycle est le cyclen, dans lesquels, dans la formule

III,

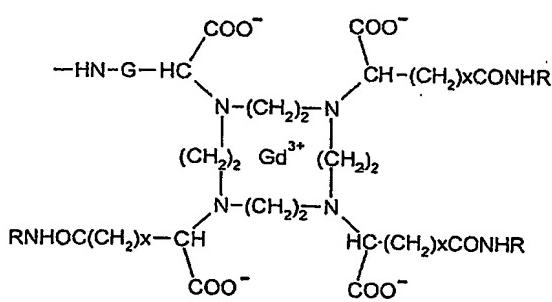
- $S_1 - T - S_2 -$

15

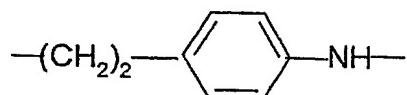
représente :



qui ont pour formule :

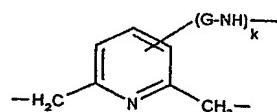


avec  $-G-NH$  étant  $-(CH_2)_3-NH-$  ou



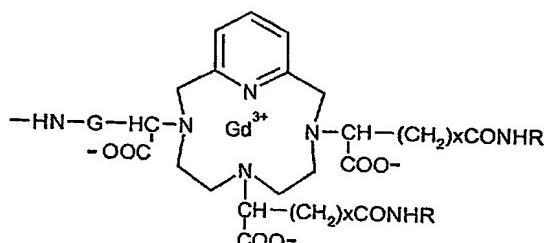
- 5     ◦ ceux dans lesquels le macrocycle est le 3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadéca-1(15),11,13-trène, fonctionnalisé sur l'un des atomes d'azote aliphatiques de formule II1' dans laquelle

$-S_1-T-S_2-$  représente :



avec  $k = 0$

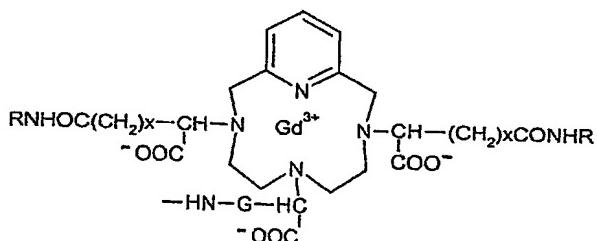
de formule :



10

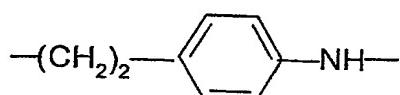
III'a1

ou :

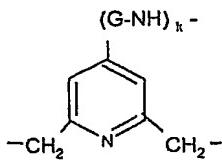


III'b1

- 15     avec  $-G-NH = -(CH_2)_3-NH-$  ou

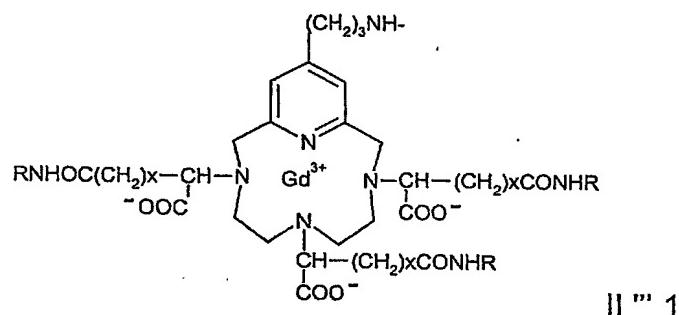


- et ceux fonctionnalisés sur le noyau pyridyle de formule II1 dans laquelle  
 $-S_1-T-S_2-$  représente :



avec  $k = 1$  et  $G = (\text{CH}_2)_3$  ;

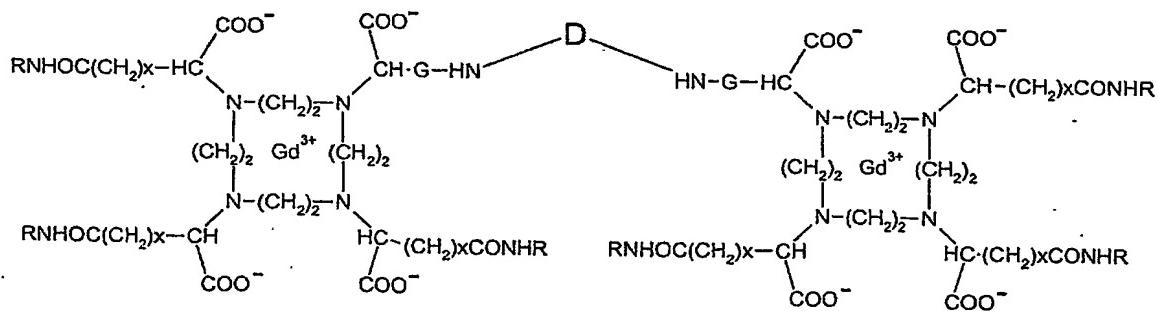
5 de formule :



et spécialement les restes A1 dans lesquels  $x = 2$ .

- 10 De manière analogue, on a préparé des composés A2 analogues des composés précédents II' 1, II" a1, II" b1, II'" 1, en remplaçant le monomère de Gd par un dimère de Gd, respectivement II' 2, II" a2, II" b2, II'" 2.

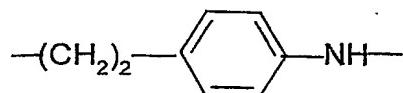
1)



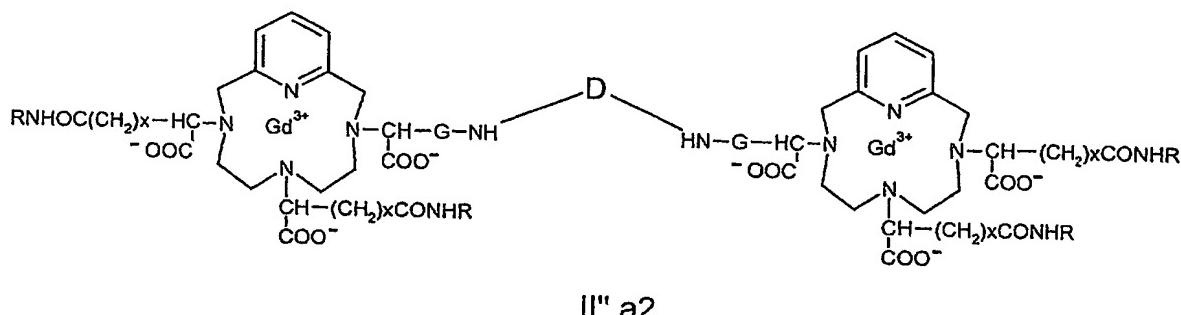
• 15

II' 2

avec  $-G-NH$  étant  $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-$  ou

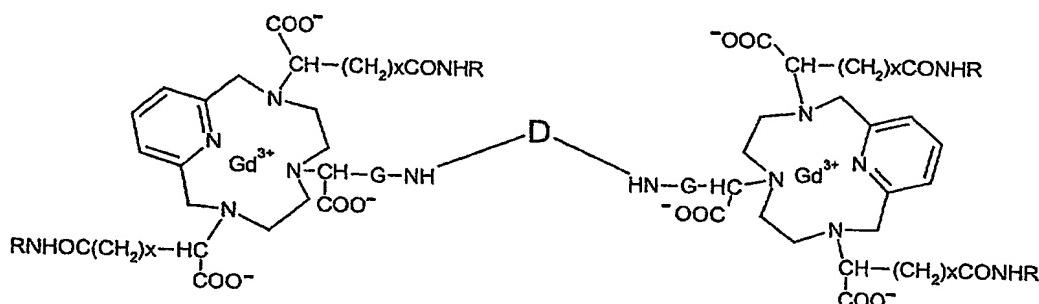


2)

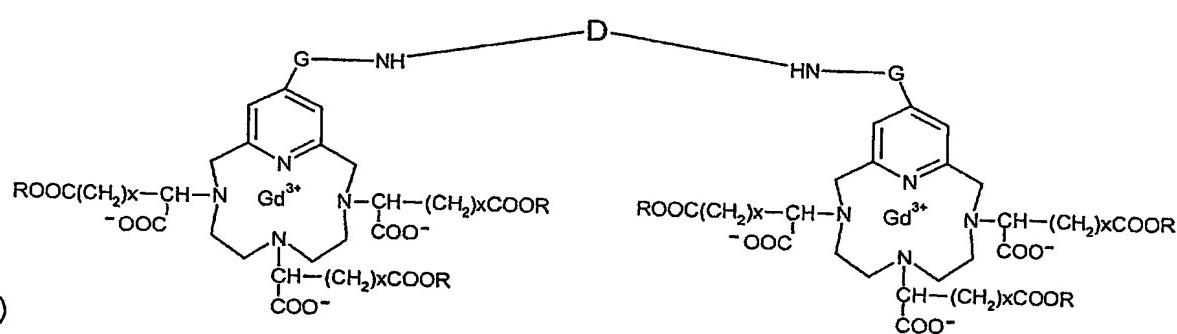
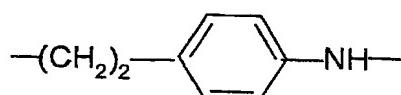


Ou II'' b2 (isomère de position de II'' a2)

5



avec -G-NH étant  $-(CH_2)_3-NH-$  ou



Avec G-NH étant  $-(CH_2)_3-NH-$ .

et spécialement les restes A2 dans lesquels  $x = 2$ .

15

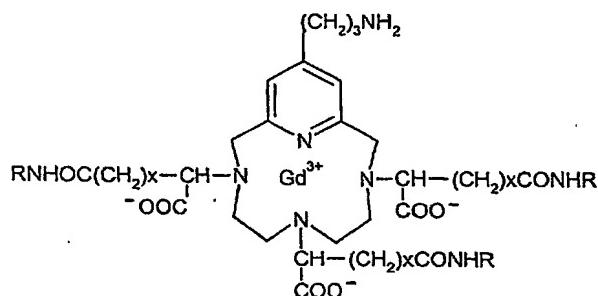
Les composés de formules II''' 2, II'' a2, II'' b2 sont obtenus au départ de deux équivalents des composés de structure V<sub>1</sub> tels que définis dans la demande, par double réaction de

substitution sur le 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine en milieu aqueux ou dans un mélange composé d'eau et d'un solvant polaire miscible à l'eau, en contrôlant le pH et la température.

Les résidus de formule R- sont introduits par couplage peptidique selon les méthodes connues de l'homme du métier, des amines correspondantes de formule R-NH<sub>2</sub> dont la structure a été définie précédemment, par exemple en milieu aqueux en présence d'un agent de couplage compatible comme l'EDCI et éventuellement d'un catalyseur.

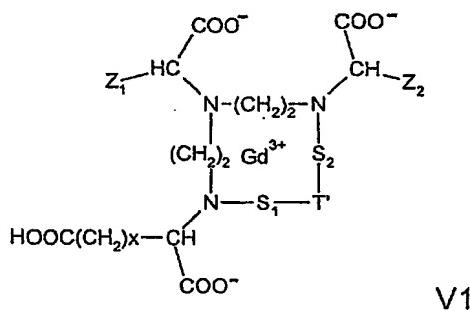
Le troisième atome de chlore est finalement déplacé par un large excès de diamine par exemple de formule H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-NH<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> avec a=2 à 5 et b=1 à 4.

Les composés de formule II'''<sub>2</sub> sont préparés au départ des précurseurs aminés dérivés des résidus de formule II'''<sub>1</sub> et de structure :



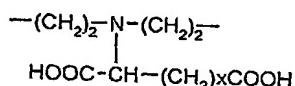
selon un protocole analogue par double substitution du cycle triazine et déplacement de l'atome de chlore résiduel par un large excès de diamine tel que défini précédemment.

Pour synthétiser des composés A1, on a utilisé des précurseurs A'1NH de formule :



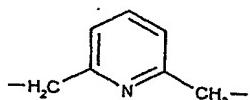
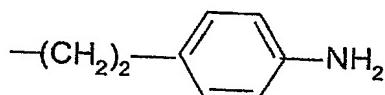
dans laquelle x = 1, 2 ou 3 et -S<sub>1</sub>-T'-S<sub>2</sub>- est :

1)

avec  $S_1 = S_2 = (\text{CH}_2)_2$ 

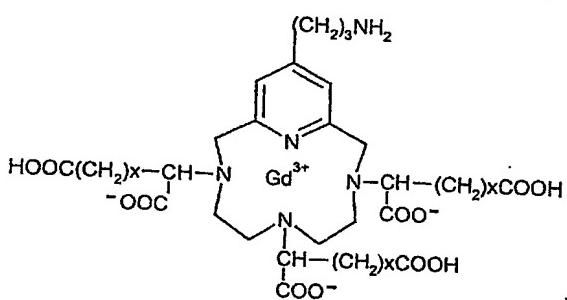
ou

5 2)

avec  $S_1 = S_2 = \text{CH}_2$ et l'un des groupes  $Z_1$  ou  $Z_2$  est choisi parmi les groupes  $\text{---}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  ou

- 10 dans lequel le groupe  $\text{NH}_2$  peut être éventuellement protégé de façon classique, sous forme de carbamate, de phtalimide ou de benzylamine comme décrit de façon générale dans *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., Ed. T.W. Greene, Pig. M. Wuts (J. Wiley) p. 494-653,  
et l'autre des  $Z_1$  ou  $Z_2$  est  $(\text{CH}_2)_x\text{COOH}$ .
- 15 Les composés V1 du 1) sont désignés de type DOTA FR, les composés du 2) sont désignés de type PCTA FR N fonctionnalisé.

On a aussi utilisé des précurseurs A'1NH de formule :



VI 1

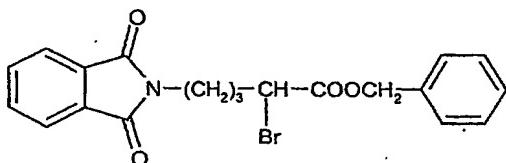
20

avec  $x = 1, 2, 3$ dans lequel le groupe  $\text{NH}_2$  est éventuellement protégé ou salifié,  
et particulièrement les composés V1 et VI1 dans lesquels  $x = 2$ .

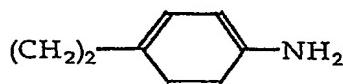
- Ces composés VI1 sont désignés PCTA FR du type C fonctionnalisé, la fonction amine étant située sur le cycle externe.

Dans le cas où l'on a utilisé comme diviseur DIV le reste 1,3,5-triazino, on fait réagir de préférence le précurseur V1, VI1 ou VI'1 sur la 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine dans les conditions habituelles d'une substitution nucléophile en présence d'une base dans un solvant polaire aprotique, éventuellement en mélange avec de l'eau, 5 notamment comme décrit dans Comprehensive Organic Chemistry, D. Bostow, W. Ollis, vol. 4, p. 150-152 (Pergamon Press) ou dans Tetrahedron Letters, 41(11), 2000, 1837-1840. On peut effectuer la réaction en présence d'une base minérale telle que NaOH ou Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ou d'une amine tertiaire, telle que la triéthylamine, par exemple dans l'eau en présence de 5 à 60% en volume de dioxane-1,6, de tétrahydrofurane ou de 10 diméthylformamide.

Pour préparer les composés intermédiaires de formule V1 dans lesquels Z<sub>1</sub> ou Z<sub>2</sub> représente (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, on peut faire réagir dans une première étape sur le composé macrocyclique correspondant dans lequel l'atome d'azote porteur dudit groupe Z<sub>1</sub> ou Z<sub>2</sub> 15 est libre et les autres atomes d'azote ont été éventuellement préalablement protégés, de façon connue en soi, le composé Y'1-Br de formule :

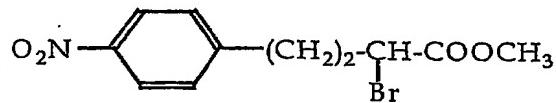


préparé selon Tetrahedron Letters 38(47), 1997, 8253-8256 et J. Org. Chem., 50, 1985, 20 560-565, tandis que pour ceux dans lesquels Z<sub>1</sub> ou Z<sub>2</sub> représente :



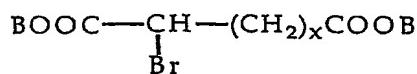
20

on fait réagir le composé Y"1-Br de formule :



décrit dans J. Org. Chem. 58, 1993, 3869-3876.

On fait ensuite réagir sur les autres atomes d'azote macrocyclique après leur 25 éventuelle déprotection, le diacide bromé, protégé sous forme d'ester Y'"1Br :



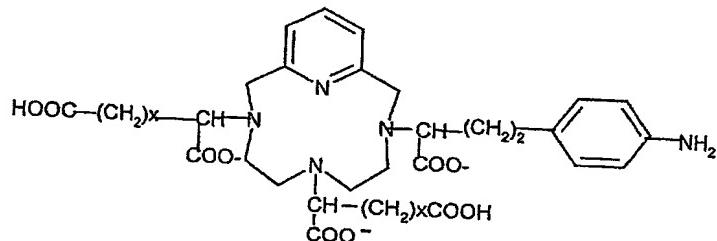
lequel peut être par exemple préparé :

- pour  $x = 1$ ,  $B = \text{diphénylméthyle}$ ,  
selon J.B.I.C. 4, 1999, 341-347 ;
- pour  $x = 2$ ,  $B = (\text{C}_1\text{-C}_3)\text{alkyle ou benzyle}$ ,  
selon WO 00/75241 ;
- et pour  $x = 3$ ,  $B = \text{CH}_3$ ,  
selon EP-A-614 899,

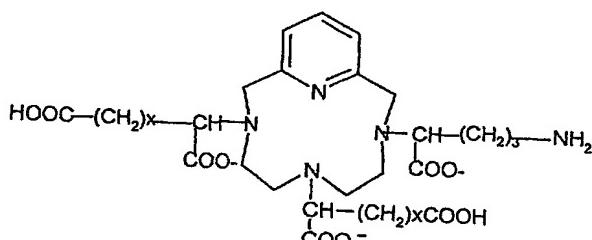
avant de libérer la fonction amine du groupe phtalimido ou de réduire le groupe nitro introduits précédemment. Les fonctions acides sont déprotégées par action d'une base ou d'un acide en milieu aqueux ou hydroalcoolique, avant ou après la formation du groupe amino.

Après libération des fonctions acides carboxyliques, le complexe de gadolinium est ensuite préparé selon l'une des méthodes connues notamment de US 5,554,748 ou Helv. Chim. Acta, 69, 1986, 2067-2074, par action de  $\text{Gd}_2\text{O}_3$  sur  $\text{GdCl}_3$  en milieu aqueux à pH compris entre 5 et 7.

Lors de la préparation du produit de formule V dans lequel  $T'$  représente le pyridyle, lorsque, dans la première étape,  $\text{Y}'\text{Br}$  ou  $\text{Y}''\text{Br}$  sont mis à réagir sur le macrocycle dont aucun des atomes d'azote n'est bloqué, on obtient, après réaction avec  $\text{Y}'''\text{Br}$  et formation du groupe amino, les dérivés dissymétriques du type :



VII 1



VII' 1

Ces composés VII'1 sont désignés PCTA FR du type N fonctionnalisé, la fonction amine étant située sur un bras latéral.

Pour obtenir le dérivé substitué symétriquement, on peut utiliser le procédé selon le schéma réactionnel du tableau 1 suivant dans lequel x et B ont les significations précédentes, à partir de la triamine protégée (a) décrite dans Tetrahedron Letters, 41(39), 2000, 7443-7446, suivi des étapes analogues à celles citées pour le composé dissymétrique :

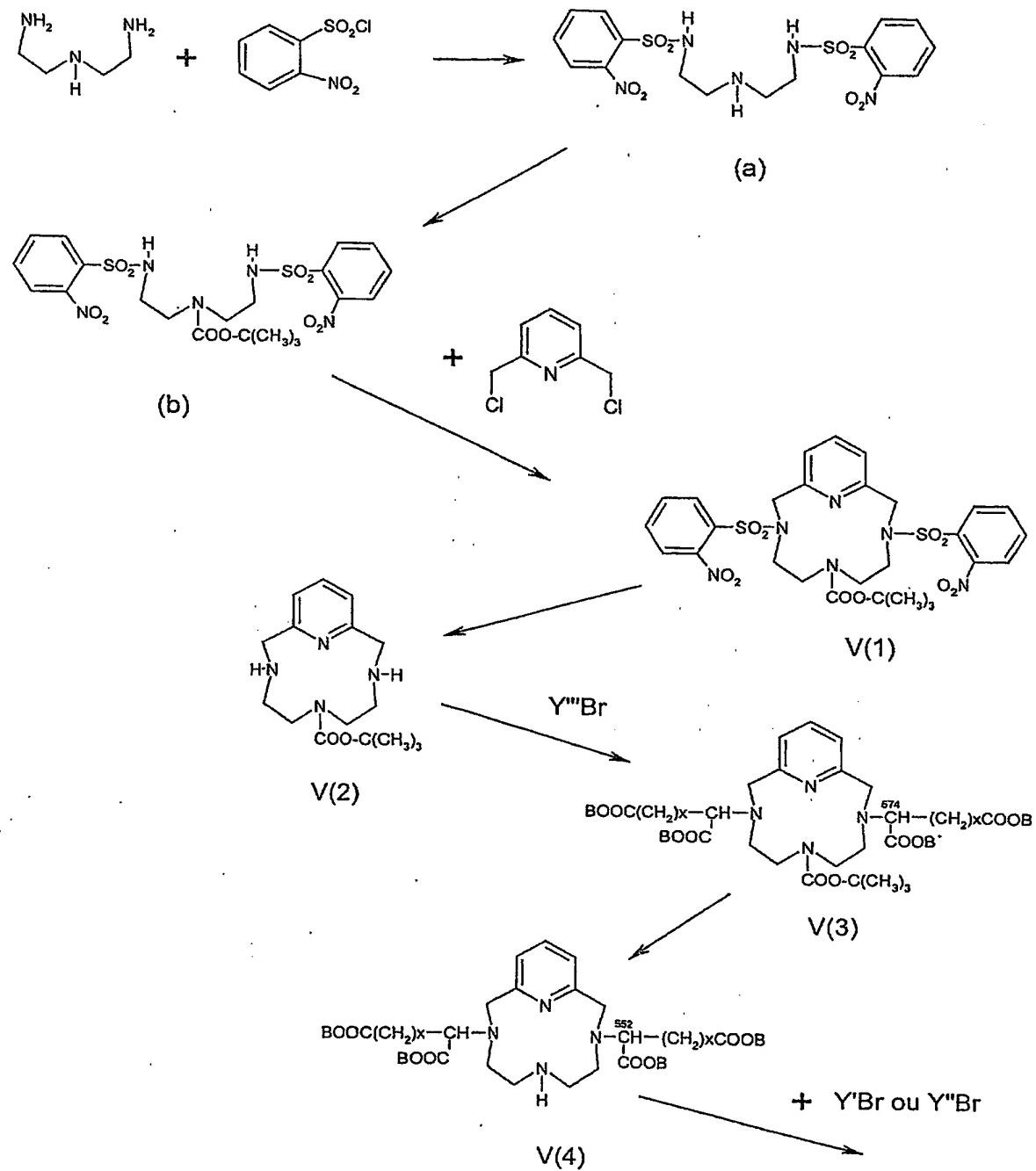
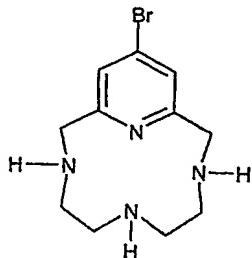


TABLEAU 1

(Les composés V (1) à V(4) sont des intermédiaires de V.1.

Pour préparer les composés de formule VI 1, on effectue une réaction de Heck sur le macrocycle bicyclique, bromé sur le noyau pyridyle, de formule :



- 5 décrit dans J. Heterocyclic Chem. 27, 1990, 167-169, suivi d'une réduction. La réaction de Heck peut être réalisée dans les conditions décrites dans Metal Catalyzed cross-coupling reactions, Ed. F. Diederich, P.J. Stang, Wiley, VCH, chap. 3, p. 99-166. Le schéma réactionnel des premières étapes du procédé de la préparation de VI est représenté tableau 2 ; on effectue ensuite l'hydrolyse des groupes esters et la complexation du gadolinium, avant ou après la déprotection du groupe amino par action de l'acide trifluoroacétique.
- 10

Pour préparer les amides résultant de la réaction du composé VI avec une amine  $\text{RNH}_2$ , on préfère effectuer l'amidification avant la déprotection de l'amine aliphatique.

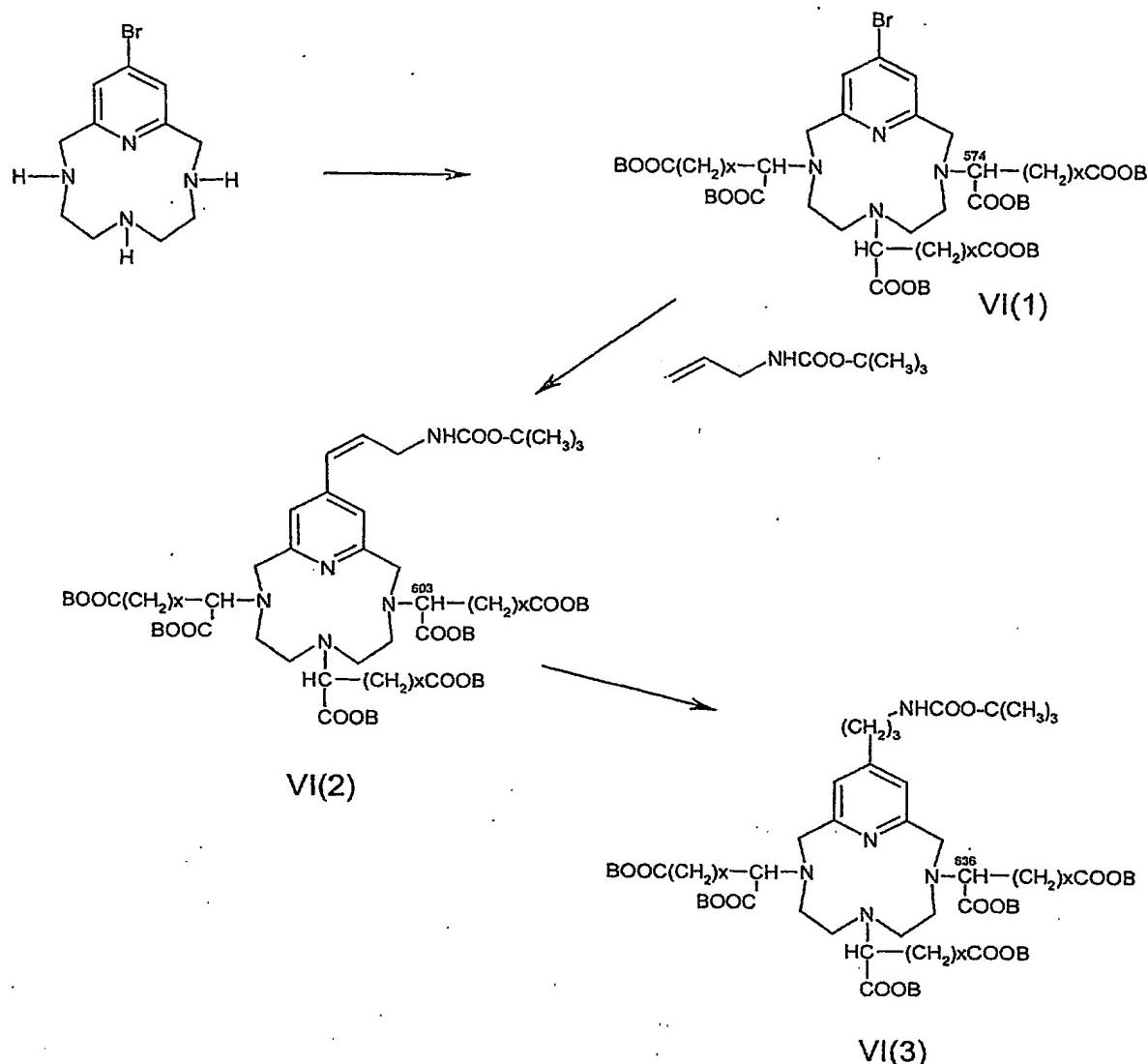
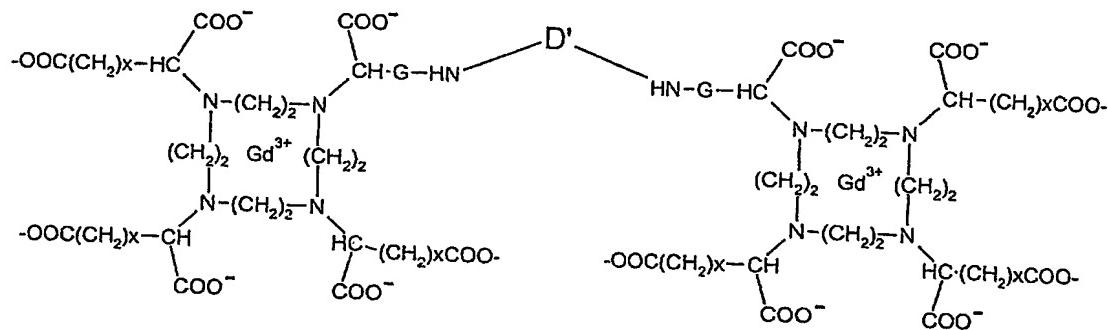


TABLEAU 2

Les composés VI (1) à VI (4) sont des intermédiaires de VI 1.

De manière analogue, les composés A2 ont été obtenus à partir de précurseurs  $\text{A}'_2\text{NH}$ , dimères de formule :

1)

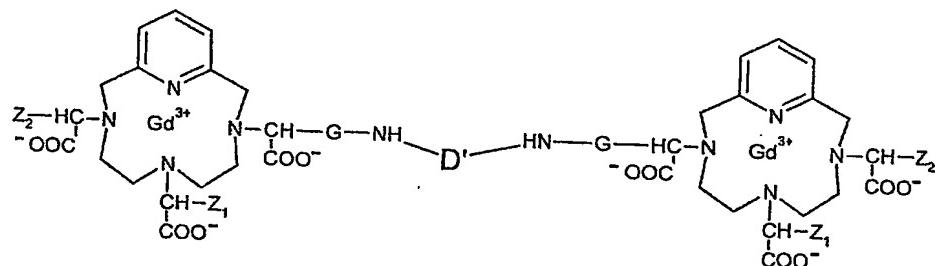


V2 précurseur de II'2

5

dans laquelle  $x = 1, 2$  ou  $3$  de préférence  $x=2$ 

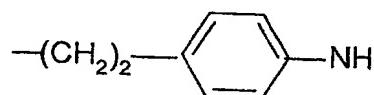
2)



10

V'' a2 précurseur de II'' a2

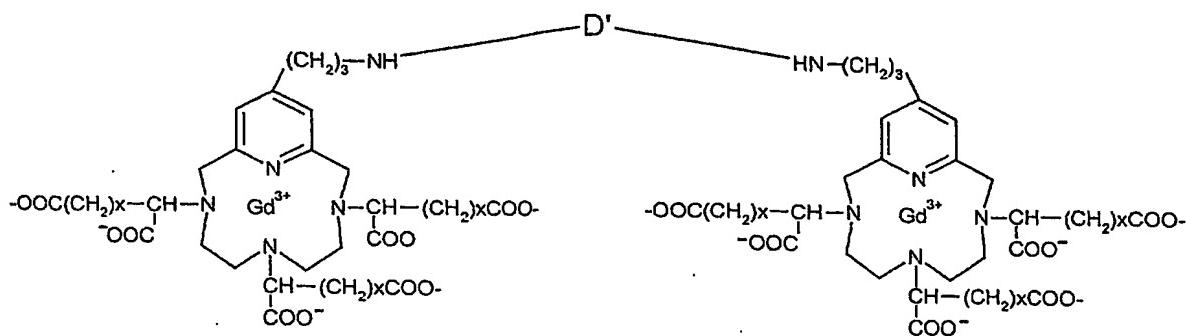
avec pour 1) et 2) :

- G-NH est choisi parmi les groupes  $-(-CH_2)_3NH$  ou

15 avec pour 2) :

Z<sub>1</sub> et Z<sub>2</sub> sont  $(CH_2)_xCOOH$ . dans lesquelles  $x = 1, 2$  ou  $3$  de préférence  
 $x=2$

3)



5

avec  $x=1, 2$  ou  $3$ , de préférence  $x=2$

L'invention concerne selon un aspect des composés intermédiaires pour la préparation d'un composé de formule (E), lesdits intermédiaires étant de formule :

10 L - [ ( D )<sub>q</sub> - ( I<sub>a,b,c,d,e,f,g</sub>)<sub>r</sub> ]

notamment les composés II'2, II"2, II"b2, II'"2 couplés à un linker L de type squarate. En effet, ces intermédiaires de structure nouvelle et inventive permettent de fabriquer des composés (E) polymétalliques à forte relaxivité et de bonne sélectivité

15. Après avoir décrit la partie chélate FR, on décrit maintenant la partie biovecteur.

Selon un mode de réalisation préféré, le biovecteur est un agent capable de cibler des récepteurs cellulaires ou des composants tissulaires (matrice extracellulaire, protéases ...) choisis parmi les récepteurs des cellules myocardiques, des cellules endothéliales, 20 des cellules épithéliales, des cellules tumorales, des cellules du système immunitaire, des composants de l'architecture de tissus sains ou pathologiques).

Grâce aux chélates FR utilisés dont la relaxivité est élevée (d'au moins 20 à 30 mMol-1Gd-1), la relaxivité des composés biovecteurs FR obtenus l'est aussi, y compris pour de petites molécules de biovecteurs. Cela constitue encore un avantage par rapport à 25 des produits de l'art antérieur qui pour augmenter la relaxivité utilisent comme biovecteurs des protéines couplées à la partie signal.

En matière de solubilité, les propriétés sont aussi très avantageuses. Les biovecteurs utilisés posent souvent des problèmes de solubilité, comme c'est le cas par exemple pour l'acide folique et de nombreux peptides. Les composés biovecteurs FR des

inventeurs ont au contraire de bonnes propriétés de solubilité, grâce aux groupements R hydrophiles.

5 On décrit maintenant plusieurs modes de réalisation associés à différents domaines pathologiques.

Concernant le domaine cardiovasculaire et la plaque d'athérome à risque, différents systèmes/mécanismes biologiques présents dans la plaque d'athérome sont des cibles privilégiées pour les agents de contraste ou thérapeutiques selon l'invention : le système faisant intervenir des métalloprotéases (MMP), le système du thrombus, le 10 système de l'annexine V.

On sait que les Matrix Metalloprotéinases ( MMP ) ou Matrixines, sont des enzymes qui possèdent la propriété de dégrader les composants protéiques de la matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire qui entoure cellules et tissus est constituée de protéines comme le collagène. Les MMP ont été classées en 3 groupes : les 15 gélatinases (Collagénases type IV), les Stromelisines, les Collagénases interstitielles. Les MMP sont surexprimées dans les plaques d'athérome. Dans le domaine cardiovasculaire, de nombreuses études indiquent que les MMPs sont impliquées dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire au niveau de la plaque. Pour ce qui est des plaques d'athéromes, au moins huit MMPs y sont surexprimées:

20

| Enzyme                     | Référence |
|----------------------------|-----------|
| MMP                        |           |
| Collagénase interstitielle | MMP-1     |
| Gélatinase A               | MMP-2     |
| Gélatinase B               | MMP-9     |
| Stromélysine-1             | MMP-3     |
| Matrilysine                | MMP-7     |
| Elastase macrophagique     | MMP-12    |
| Collagénase-3              | MMP-13    |
| MMP-membranaire MT-MMP-1   | MMP-14    |

Les MMP1 et 3 sont notamment décrites dans Johnson J et al. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. Arterioscl Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1707-1715.

L'invention concerne ainsi des produits BIOVECTEURS – FR dont le biovecteur est un inhibiteur de MMP, pour des applications dans les domaines cardiovasculaire. Selon une réalisation préférée, l'inhibiteur est un dérivé de l'Iломастат ou un peptide tel qu'exemplifié plus loin.

- 5 On préférera aussi des composés de formule générale  $I_x-L_n-(Ch\ FR)_y$ , avec les inhibiteurs  $I_x$  de MMP choisis parmi ceux décrits dans Current Medicinal Chemistry, 2001, 8, 425-474 ; Chem.Rev, 1999, 99, 2735-2776. On pourra notamment utiliser des inhibiteurs de MMP désignés TIMP rappelés dans DDT vol 1, N°1, January 1996, Elsevier Science, 16-17 ; Bioconjugate Chem, 2001, 12, 964-971 .

10

Pour le thrombus, il est connu que :

- le récepteur Gplliblla est exprimé sur les plaquettes activées (il est déjà utilisé en thérapeutique comme cible d'agents antiplaquettaires)
- la fibrine est associée à la thrombose.

15 Plus précisément en ce qui concerne le thrombus, l'intervention de glycoprotéines Gplliblla sur les plaquettes activées a été démontrée. Les plaquettes sont des fragments anucléés des megacaryocytes de la moelle osseuse qui jouent un rôle pivot dans les processus d'athérosclérose et de thrombose. Les médicaments antiplaquettaires classiques les plus utilisés sont l'aspirine, la ticlopidine et le clopidogel.

20 La connaissance des mécanismes moléculaires aboutissant à l'agrégation plaquettaire a permis le développement d'une nouvelle famille de molécules dirigées contre le récepteur plaquettaire du fibrinogène, l'intégrine GP IIb/IIIa. L'avantage majeur par rapport aux antagonistes cités précédemment est de bloquer l'étape finale de l'activation des plaquettes, indépendamment de la voie d'activation des plaquettes.

25 L'interaction plaquette-plaquette étant critique pour la formation du thrombus, la fixation du fibrinogène (qui forme des ponts entre les plaquettes) sur le complexe GP IIb/IIIa est un événement clé dans l'hémostase et la thrombose. Quand les plaquettes sont activées, les récepteurs glycoprotéiques GP IIb/IIIa qui se trouvent à la surface des membranes des plaquettes, subissent une modification de leur conformation spatiale et

30 peuvent alors fixer des molécules de fibrinogène soluble dans le plasma et du calcium. Le fibrinogène établit les liens entre les plaquettes par l'intermédiaire de ponts  $Ca^{2+}$ -fibrinogène formant un réseau dans lequel vont être emprisonnées les hématies. La thrombine en transformant le fibrinogène en fibrine resserre les mailles de ce filet. Cette agrégation va conduire à la formation d'un thrombus au niveau de la zone lésée. De

nombreux efforts ont donc été réalisés afin d'identifier sur le récepteur GP IIb/IIIa, les sites d'interaction des ligands. Le complexe GP IIb/IIIa est un complexe hétérodimérique glycoprotéique membranaire important des plaquettes (environ 50000 copies par plaquette).

5 Au moins deux séries de peptides, correspondant à des séquences d'acides aminées présentes naturellement dans le fibrinogène humain, sont connues pour inhiber la fixation des macromolécules adhésives sur le récepteur GPIIb/IIIa : la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) et la chaîne gamma Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val.

10 La séquence Arg-Gly-Asp (RGD) a initialement été identifiée comme la séquence adhésive de la fibronectine, intégrine qui joue un rôle important dans les interactions plaquettes-plaquettes et plaquettes-vaisseaux après sa libération par les plaquettes. Cette séquence est également présente dans le fibrinogène, le facteur von Willebrand et la vitronectine (rôle dans la fibrinolyse et la liaison aux vaisseaux).

15 Le complexe GPIIb/IIIa reconnaît cette séquence qui inhibe la fixation de la fibronectine, du fibrinogène, du facteur de von Willebrand et la vitronectine sur les plaquettes. Tous ces ligands contiennent au moins une séquence RGD; alors que le fibrinogène en contient deux par demi-molécule. In vivo, le fibrinogène est le principal ligand du fait de sa forte concentration dans le plasma.

L'invention concerne ainsi :

- 20 - des produits BIOVÉCTEURS – FR dont le biovecteur est capable de cibler le récepteur GpIIbIIIa .  
- des produits BIOVÉCTEURS – FR dont le biovecteur est capable de cibler la fibrine, notamment par des peptides sélectifs des monomères de fibrine afin de différencier la fibrine de la molécule soluble de fibrinogène.

25 L'invention concerne en particulier des produits BIOVÉCTEURS – FR dont le biovecteur comprend un motif RGD, pour des applications cardiovasculaires.

On pourra par exemple utiliser des peptides décrits dans WO 2001/9188, Seminars in nuclear medicine, 1990, 52-67, Nuclear Medicine and Radiology, 28,2001,515-526, le bibapctide Acutect de la société Diatide.

30

Concernant le domaine oncologie, l'imagerie spécifique obtenue par la présente invention vise à obtenir selon une réalisation un marquage de la néo-angiogénèse, un ciblage spécifiquement des cellules tumorales ou des altérations de la matrice extracellulaire, non obtenues par les techniques connues. Différents systèmes (ou

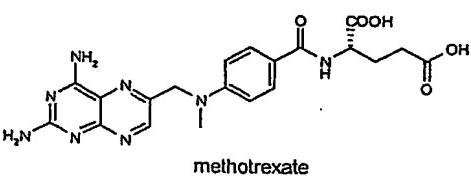
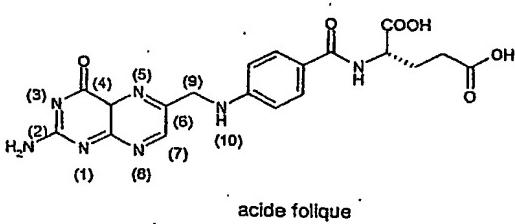
mécanismes) biologiques associés au développement tumoral sont des cibles privilégiées pour les agents de contraste ou thérapeutiques selon l'invention : le système faisant intervenir des composés capable de se lier à des récepteurs aux folates, le système faisant intervenir les MMP, le système faisant intervenir des facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse.

Il est connu que les folates jouent un rôle essentiel dans la biosynthèse des bases puriques et pyrimidiniques de tous les organismes vivants. Ils sont ainsi impliqués dans les processus de prolifération cellulaire faisant intervenir différents enzymes utilisant les folates comme cofacteurs ou comme substrats. Leur métabolisme est impliqué d'une part dans la synthèse du noyau ptéridine et d'autre part dans des réactions de modification fonctionnelle, d'oxydation ou de réduction du noyau ptéridine déjà formé. L'uptake cellulaire des folates endogènes comme des antifolates peut être régulé par 2 protéines de transport :

- la Folate Binding Protein (FBP) appelée aussi Folate Receptor
- le Reduced Folate Carrier (RFC)

Le brevet US 6 221 334 rappelle l'implication des folates dans ce domaine, et décrit des composés associant l'acide folique ou le méthotrexate avec un chélate.

La demande WO 02/087424 décrit des composés associant des folates avec un chélate à faible relaxivité, ces folates étant nécessairement dépourvus d'acides aminés naturels, ce qui n'est pas nécessairement le cas des biovecteurs folates de la présente invention.

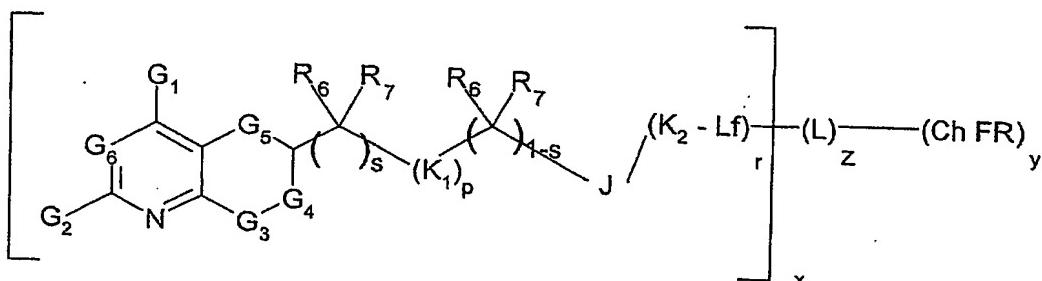


L'invention concerne selon un mode de réalisation des produits BIOVÉCTEURS – FR dont le biovecteur est un dérivé capable de cibler un récepteur au folate, ce biovecteur

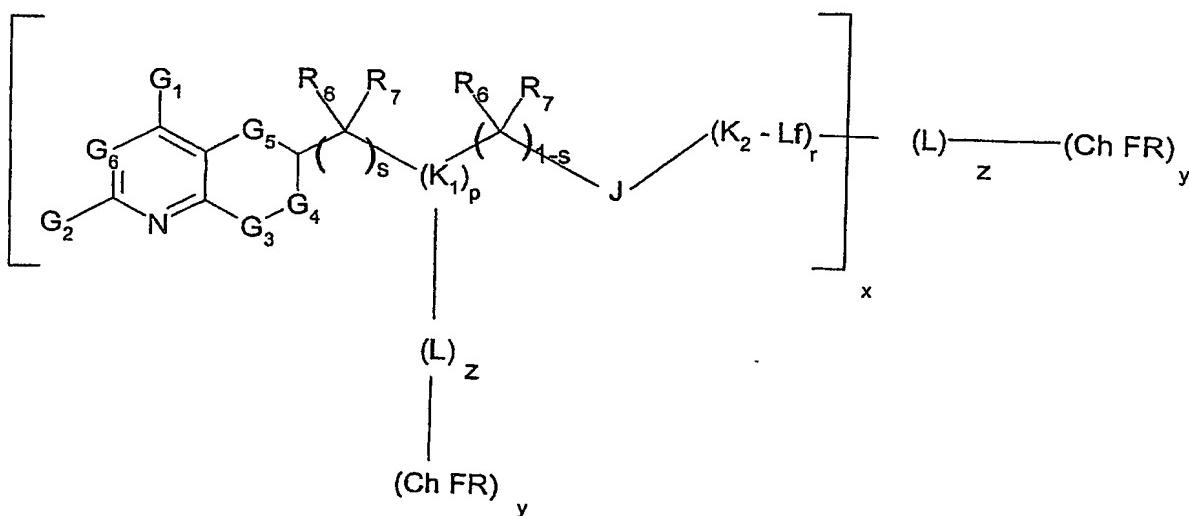
étant capable de donner lieu à une reconnaissance spécifique de cellules tumorales, et étant couplé à un chélate immobilisé Ch FR.

L'invention concerne en particulier les composés (E) s'écrivant :

5 (E1) :



ou (E2) :



dans laquelle :

- 10 a) G1 est choisi indépendamment dans le groupe constitué par : halo, R<sub>f</sub>2, O R<sub>f</sub>2, S R<sub>f</sub>  
3, N R<sub>f</sub>4 R<sub>f</sub>5 ; de préférence G1 est choisi NH<sub>2</sub> ou OH
- b) G2 est choisi indépendamment dans le groupe constitué par : halo, R<sub>f</sub>2, O R<sub>f</sub>2, S R<sub>f</sub>  
3, and N R<sub>f</sub>4 R<sub>f</sub>5 ;
- c) G3, G4 représentent des groupes divalents choisis indépendamment dans le groupe  
15 constitué par -(R<sub>f</sub>6')C=,-N=,-(R<sub>f</sub>6')C(R<sub>f</sub>7')-,,-N(R<sub>f</sub>4')- ;  
de préférence G3 est -N= (acide folique) ou -CH- (composés décrits plus loin : CB3717,  
raltitrexed, MAI) lorsque le cycle comprenant G3 est aromatique, et G3 est -NH- ou -  
CH2- (composés décrits plus loin : AG-2034, lometrexol) lorsque le cycle comprenant  
G3 est non aromatique ;

de préférence G4 est -CH- ou -C(CH<sub>3</sub>)- lorsque le cycle comprenant G3 est aromatique, et -CH<sub>2</sub>- ou -CH(CH<sub>3</sub>)- lorsque le cycle comprenant G3 est non aromatique ;

- f) G5 est absent (composé pemetrexed) ou choisi parmi -(R<sub>f</sub> 6') C=,-N=,-(R<sub>f</sub> 6') C(R<sub>f</sub> 7'), -N(R<sub>f</sub> 4')- ;
- g) Le cycle J est un cycle aromatique hétérocyclique ou non à 5 ou 6 sommets, les atomes du cycle pouvant être C, N, O, S ;
- h) G6 est N ou C (composé décrit plus loin : 3-deaza-ICL-198,583)
- i) K1 et K2 sont choisis indépendamment dans le groupe constitué par - C (Z<sub>f</sub>)-,-C(Z<sub>f</sub>) O-, -OC(Z<sub>f</sub>)-,-N(R<sub>f</sub> 4")-,-C(Z<sub>f</sub>)-N(R<sub>f</sub> 4), -N(R<sub>f</sub> 4")-C(Z<sub>f</sub>), -O-C(Z)-N(R<sub>f</sub> 4")-, -N(R<sub>f</sub> 4")-C(Z<sub>f</sub>)-O-, N(R<sub>f</sub> 4")-C(Z<sub>f</sub>)-N(R<sub>f</sub> 5")-, -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)2-, -N(R<sub>f</sub> 4")S(O)2-, -C(R<sub>f</sub> 6") (R<sub>f</sub> 7")-, -N(C ≡ CH)-, -N(CH<sub>2</sub>-C ≡ CH)-, C1-C12 alkyle et C1-C12 alkoxy; dans lequel Z<sub>f</sub> est O ou S ; de préférence K1 est -N(R<sub>f</sub> 4")- ou -C(R<sub>f</sub> 6") (R<sub>f</sub> 7")- avec R<sub>f</sub> 4", R<sub>f</sub> 6", R<sub>f</sub> 7" étant H ; A2 étant ou non lié de manière covalente à un acide aminé ;
- j) R<sub>f</sub> 1 est choisi dans le groupe constitué par : H, halo, C1-C12 alkyl, et C1-C12 alkoxy ; R<sub>f</sub> 2, R<sub>f</sub> 3, R<sub>f</sub> 4, R<sub>f</sub> 4', R<sub>f</sub> 4", R<sub>f</sub> 5, R<sub>f</sub> 5", R<sub>f</sub> 6" et R<sub>f</sub> 7" sont choisis indépendamment dans le groupe constitué par : H, halo, C1-C12 alkyle, C1-C12 alkoxy, C,-C, 2 alkanoyle, C,-C, 2 alcényle, C1-C12 alcynyle, (C1-C12 alkoxy)carbonyle, et (C,-C, 2 alkylamino) carbonyle;
- h) R<sub>f</sub> 6 et R<sub>f</sub> 7 sont choisis indépendamment dans le groupe constitué par : H, halo, C1-C12 alkyle, C1-C12 alkoxy ; ou R<sub>f</sub> 6 et R<sub>f</sub> 7 forment ensemble O= ;
- i) R<sub>f</sub> 6' and R<sub>f</sub> 7' sont choisis indépendamment dans le groupe constitué par : H, halo, C1-C12 alkyle, C1-C12 alkoxy ; ou R<sub>f</sub> 6' et R<sub>f</sub> 7' forment ensemble O= ;
- j) Lf est un lien divalent incluant le cas échéant un acide aminé naturel ou un poly acide aminé naturel, lié à K2 ou à K1 par son groupement alpha-amino par une liaison amide ;
- k) n, p, r et s sont indépendamment 0 ou 1.

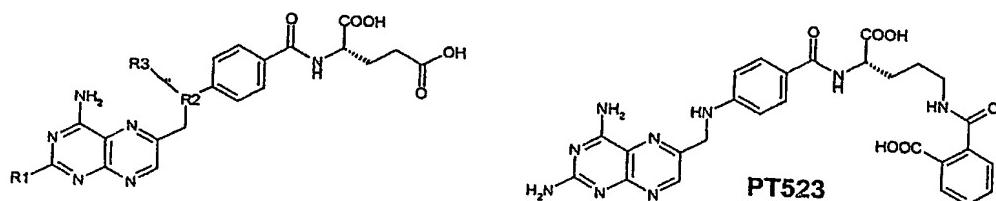
La formule (E) inclut les formes tautomériques, par exemple des composés pour lesquels G1 est OH, SH ou NH.

Pour les composés de l'invention dans lesquels au moins un des groupes K1, K2, R<sub>f</sub> 1, R<sub>f</sub> 2, R<sub>f</sub> 3, R<sub>f</sub> 4, R<sub>f</sub> 4', R<sub>f</sub> 4", R<sub>f</sub> 5, R<sub>f</sub> 5", R<sub>f</sub> 6, R<sub>f</sub> 7", R<sub>f</sub> 6, R<sub>f</sub> 7, R<sub>f</sub> 6' et R<sub>f</sub> 7' comprend

un groupe alkyle, alkoxy, alkylamino, alkanoyle, alcényle, alcynyle, alkoxy carbonyle, alkylamino carbonyle, le groupe comprend de préférence 1 à 6 atomes de carbone (C1-C6), encore de préférence 1 à 4 atomes de carbone (C1-C4).

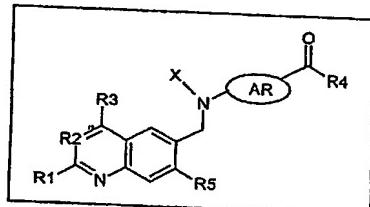
5 Parmi les composés énoncés ci-dessus, les inventeurs se sont notamment intéressés aux dérivés

a)



|                        | R1              | R2 | R3              |                        | R1              | R2 | R3                            |
|------------------------|-----------------|----|-----------------|------------------------|-----------------|----|-------------------------------|
| MTX                    | NH <sub>2</sub> | N  | CH <sub>3</sub> | 2-dAMT                 | H               | N  | H                             |
| 2-dMTX                 | H               | N  | CH <sub>3</sub> | 2-CH <sub>3</sub> -AMT | CH <sub>3</sub> | N  | H                             |
| 2-CH <sub>3</sub> -MTX | CH <sub>3</sub> | N  | CH <sub>3</sub> | Edatrexate             | NH <sub>2</sub> | C  | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |
| AMT                    | NH <sub>2</sub> | N  | H               |                        |                 |    |                               |

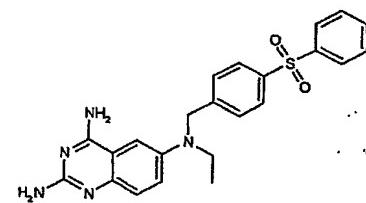
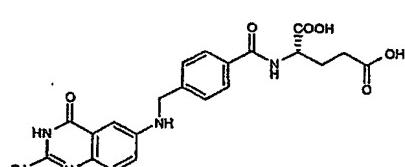
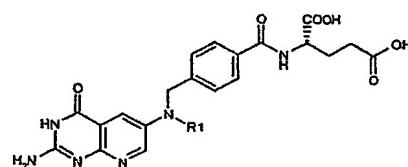
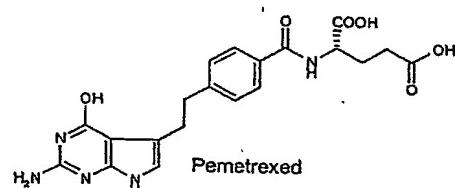
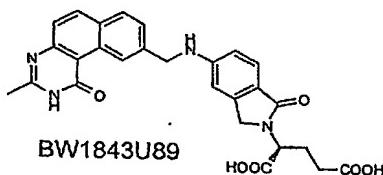
10 b)



15

| X = propargyl                   | R1              |    | R3               | R4     | R5 |
|---------------------------------|-----------------|----|------------------|--------|----|
| CB3717                          | NH <sub>2</sub> | N  | OH               | Glu    | H  |
| ICI-198,583                     | CH <sub>3</sub> | N  | OH               | Glu    | H  |
| 3-deaza-ICI-198,583             | CH <sub>3</sub> | CH | OH               | Glu    | H  |
| 4-H-ICI-198,583                 | CH <sub>3</sub> | N  | H                | Glu    | H  |
| 4-OCH <sub>3</sub> -ICI-198,583 | CH <sub>3</sub> | N  | OCH <sub>3</sub> | Glu    | H  |
| Glu → Val-ICI-198,583           | CH <sub>3</sub> | N  | OH               | Valine | H  |

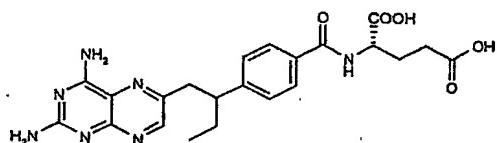
|                           |                 |    |    |          |                 |
|---------------------------|-----------------|----|----|----------|-----------------|
| Glu → Sub-ICI-            | CH <sub>3</sub> | N  | OH | Suberate | H               |
| 198,583                   |                 |    |    |          |                 |
| 7-CH <sub>3</sub> - ICI-  | CH <sub>3</sub> | N  | OH | Glu      | CH <sub>3</sub> |
| 198,583                   |                 |    |    |          |                 |
| X = méthyle               | R1              | R2 | R3 | R4       | R5              |
| raltitrexed               | CH <sub>3</sub> | N  | OH | Glu      | H               |
| 2-NH <sub>2</sub> -ZD1694 | NH <sub>2</sub> | N  | OH | Glu      | H               |



|   | R1              |
|---|-----------------|
| 5-d(I)PteGlu                                  | H               |
| N <sup>9</sup> -CH <sub>3</sub> -5-d(I)PteGlu | CH <sub>3</sub> |
| N <sup>9</sup> -CHO-5-d(I)PteGlu              | CHO             |

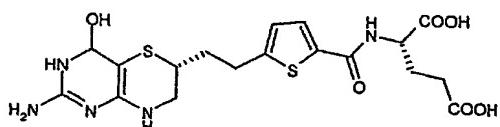
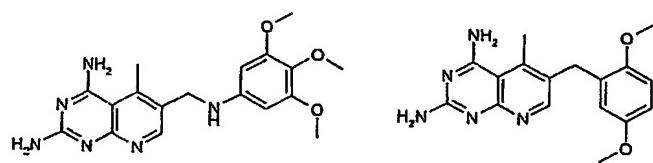
|                          | R1              |
|--------------------------|-----------------|
| IAHQ                     | NH <sub>2</sub> |
| 2-dIAHQ                  | H               |
| 2-CH <sub>3</sub> -dIAHQ | CH <sub>3</sub> |

5 L'invention concerne de manière préférée les composés (E) utilisant les biovecteurs B suivants



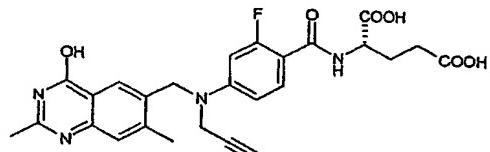
Edatrexate

En substituant le N<sup>10</sup> du MTX par un carbone porteur du groupement ethyl, l'uptake  
10 cellulaire via le RFC ainsi que la polyglutamatation sont supérieurs pour les cellules tumorales / cellules saines.



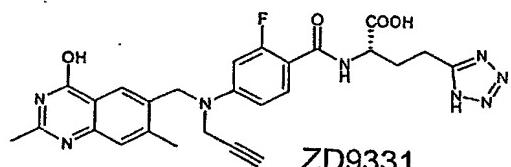
(6R) AG-2034

Le Soufre en 5 permet de mieux remplir la poche hydrophobe de GARFT que le méthylène ( $K_d / FBP = 3,2 \text{ pM}$ ).

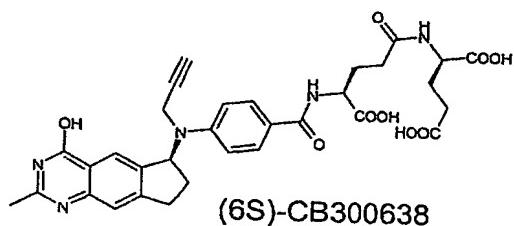


ZM214888

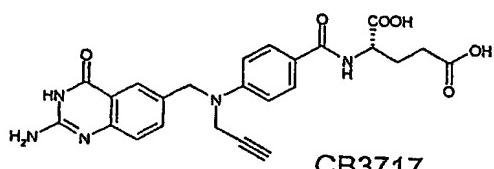
Cette structure est, comme celle de tous les composés étudiés par les inventeurs substitués sur l'azote en position 10, très éloignée de l'acide folique.



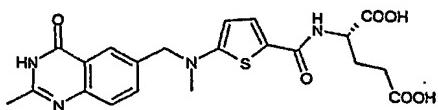
ZD9331



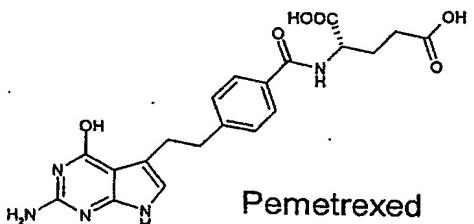
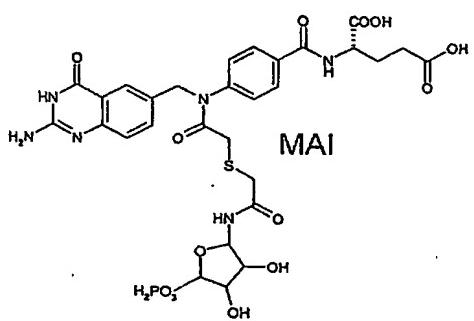
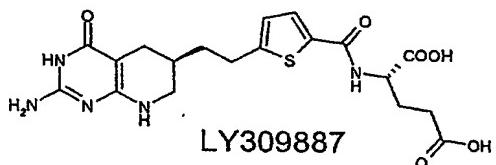
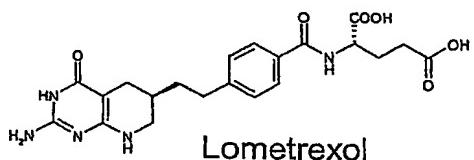
(6S)-CB300638



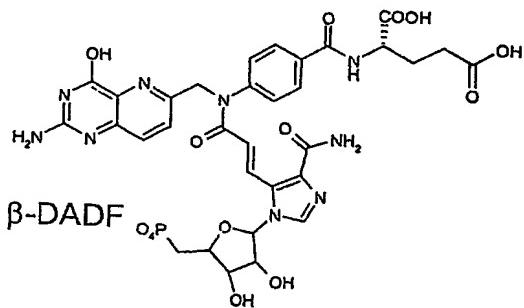
CB3717



Raltitrexed



10 Ces structures ne contenant pas le squelette ptéroïque sont très éloignées de celle de l'acide folique d'un point de vue structural.



Grâce à analyse de structure activité, les inventeurs ont identifié plusieurs structures favorables à l'interaction avec le RFC (l'affinité augmente quand l'amine en 2 est remplacée par un méthyle ; les azotes en 5 et 10 peuvent être remplacés par des carbones ; le cycle pyrazinique peut être tétrahydrogéné ou remplacé par un pyrrole (pemetrexed)), et plusieurs structures favorables à l'interaction avec la FBP (4 inhibiteurs de la thymidilate synthétase TS ont une affinité supérieure à l'acide folique : permetrexed > CB3717 > IAHQ >2-NH<sub>2</sub>-ZD1694 ; l'affinité est conservée pour les dérivés 5,8 didéazaisofolique ; le cycle pyrazinique peut être tétrahydrogéné, remplacé par un benzène (CB3717) ou remplacé par un pyrrole (pemetrexed) ; le remplacement de l'acide glutamique est possible).

Dans le cas des folates ou dérivés, lorsque Lf contient un acide aminé, le composé (E1) présente une fonction acide carboxylique en alpha et une fonction carboxylique en gamma.

a) Avec un composé de formule (E1), on peut ainsi choisir de greffer par exemple :

- un seul Ch FR, comme dans le composé BIO-FOLATE.I avec z=1, x=1, y=1, le groupe ChRR étant sous forme de dimère comprenant deux chélates reliés par un diviseur, le groupe [L – Ch FR] étant greffé en gamma ;
- ou deux groupes Ch FR, comme dans le composé BIO-FOLATE.II avec z=2, x=1, y=2, les groupes Ch FR étant sous forme de dimère, les groupes [L – Ch FR] étant greffés l'un en gamma l'autre en alpha, le composé BIO-FOLATE.II étant donc un tétramère.

b) Avec un composé de formule (E2), lorsque Lf contient un acide aminé, on peut ainsi choisir de greffer sur le K1 en position 10, et optionnellement en plus comme pour (E1) au (a).

Concernant les MMP dans le domaine oncologie, il est connu que les MMP ont deux fonctions distinctes :

- a) elles participent à la dissémination tumorale en détruisant la matrice extracellulaire;
- b) elles créent un environnement qui favorise la croissance et l'angiogénèse des tumeurs primaires et métastasées

5 Les MMP exprimées dans les principales tumeurs humaines sont notamment les suivantes :

- cancer du sein : MMP-1,2,3,7,9,11,13,14
- cancer colo-rectal : MMP-1,2,3,7,9,11
- cancer du poumon : MMP- 2,3,7,9,11,14

10 -cancer de la prostate : MMP-1,2,3,7,9

Et il y a une corrélation fréquente entre le stade de progression tumorale et le niveau d'expression des MMP. En général, les tumeurs malignes expriment une plus grande quantité de MMP que les tumeurs bénignes

15 L'invention concerne ainsi des produits BIOV рЕCTEURS – FR dont le biovecteur est un inhibiteur de MMP, pour des applications dans le domaine oncologie. Selon des réalisations préférées, on utilisera des inhibiteurs choisis parmi ceux décrits dans Current Medicinal Chemistry, 2001, 8, 425-474 ; Chem.Rev, 1999, 99, 2735-2776. On pourra notamment utiliser des inhibiteurs de MMP désignés TIMP rappelés dans DDT vol 1, N°1, January 1996, Elsevier Science, 16-17 ; Bioconjugate Chem, 2001, 12, 964-20 971.

En ce qui concerne l'angiogenèse, des études ont montré que l'angiogénèse est un facteur pronostique dans diverses tumeurs, notamment le cancer du sein, du rein, de la prostate, du côlon et du cerveau, ainsi que dans le mélanome.

25 L'invention concerne ainsi des produits BIOV рЕCTEURS – FR dont le biovecteur est capable de cibler un marqueur d'angiogenèse.

Il est montré que certains facteurs de croissance endothéliaux sont spécifiques des tumeurs. Les cellules endothéliales, qui constituent la paroi interne des vaisseaux, ne manifestent aucune tendance naturelle à la prolifération chez l'adulte sain. En revanche 30 lors de situations pathologiques, par exemple lors du développement de tumeurs ou de l'élosion de métastases, les besoins accrus en oxygène et en apports nutritifs sont véhiculés par un accroissement de l'irrigation locale. Les tumeurs/dérivent ainsi à leur profit un nouveau réseau vasculaire, processus connu sous le nom d'angiogénèse.

Le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF) est un facteur de croissance angiogénique puissant et sélectif. Il agit en stimulant au moins trois récepteurs sur la membrane extracellulaire : VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1 / KDR) et NP-1. Les récepteurs aux VEGFs appartiennent à la grande famille des RTK (Tyrosine-Kinase Receptor). Ces protéines de la famille des intégrines possèdent une région extracellulaire capable de lier les ligands, un domaine transmembranaire et une région cytoplasmique portant l'activité tyrosine kinase. Dans le cas des VEGFR, le domaine kinase est interrompu par une courte séquence spécifique à chaque récepteur.

10 L'invention concerne ainsi des produits BIOVÉCTEURS – FR dont le biovecteur est un agent capable de se lier à des récepteurs angiogéniques présents à la surface des cellules endothéliales.

On pourra utiliser notamment des biovecteurs (notamment des peptides obtenus par phage display) décrits dans les documents WO 01/012809, WO 01/83693, WO 15 02/057299 (peptides de 8 acides aminés ciblant VEGFR3) ; Nuclear Medicine Communications (1999), 20, Pharmacological Review, 179, 206,2000 ; Journal of Biological Chemistry,2000,275,13588-13596 ; Journal of Biological Chemistry, 2002, 277,45, 43137-43142 ; J. Mol. Biol., 2001, 316, 769-787 ; Biochemistry, 1998, 37, 17754-17772 ; Chem. J. Biochem. Mol. biol, 2000, 16,803-806. On pourra notamment 20 utiliser (i) des inhibiteurs de l'activité enzymatique liée aux VEGF tels que des composés quinazolines, aminothiazoles, anthranilamide, (ii) des composés antagonistes de VEGF, notamment des petites molécules telles que des dibenzothiophènes et des molécules de documents JP2001-353075, JP2000-395413, des anticorps

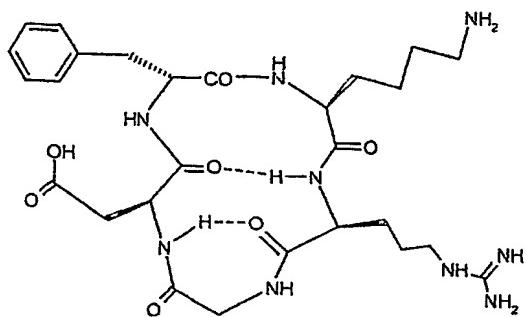
25 On sait aussi que l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  est peu exprimée dans le système vasculaire mais est surexprimée dans les cellules tumorales (glioblastome dernier stade, carcinome ovarien, mélanome). L' $\alpha v\beta 3$  prend part à l'angiogénèse à différents stades : l' $\alpha v\beta 3$  régule l'adhésion des cellules endothéliales à la matrice, il transmet des signaux aux 30 noyaux des cellules et est un récepteur pro-angiogénique en coopérant avec le récepteur du facteur de croissance des cellules endothéliales (VEGFR-2, flk). L' $\alpha v\beta 3$ , en action avec la metalloprotéinase-1 de la membrane (MT1-MMP) est responsable de l'activation de la metalloprotéinase-2 de la matrice à la surface des cellules. Le blocage de ce récepteur mais aussi de l' $\alpha v\beta 5$  par des peptides RGD ou par des anticorps induit

l'apoptose des cellules. L' $\alpha v\beta 3$  comme l' $\alpha v\beta 5$  interviennent surtout dans la phase de prolifération de l'angiogénèse. De nombreuses protéines de la matrice possèdent une séquence commune : Arg-Gly-Asp (notée RGD) qui a été identifiée comme le site d'interaction avec certaines intégrines. Un grand nombre d'inhibiteurs d'angiogénèse 5 comprenant cette séquence RGD ont ainsi été développés.

L'invention concerne ainsi des produits BIOVECTEURS – FR dont le biovecteur est un peptide RGD approprié pour des applications en oncologie.

Pour les peptides RGD ciblant l' $\alpha v\beta 3$  les inventeurs préfèrent des biovecteurs qui 10 permettent d'inhiber l'angiogénèse présentant une forte affinité pour l' $\alpha v\beta 3$  (afin d'empêcher la fixation des protéines de la matrice) mais une faible affinité pour l' $\alpha IIb\beta 3$ . En effet il a été montré que les antagonistes de l' $\alpha IIb\beta 3$  pouvaient provoquer des problèmes de saignement indésirables. Les inventeurs préfèrent en particulier des antagonistes ayant une séquence peptidique RGD cyclique plus stable face à la 15 dégradation enzymatique et une meilleure affinité et sélectivité, la conformation du peptide étant maintenue dans une position privilégiée en raison de la restriction des rotations.

Plus précisément après une analyse structure activité des peptides RGD, les inventeurs préfèrent tout particulièrement, pour être dans des conditions favorables à un maintien 20 de l'affinité pour l' $\alpha v\beta 3$ , des peptides RGD cycliques afin de prévenir de la dégradation par les enzymes (exo et endo peptidase), avec un cycle assez court afin qu'il soit plus rigide (cycle à 5 préférable à un cycle à 6 acides aminés), avec un acide aminé de configuration D. La distance entre les carbones  $\beta$  de l'acide aspartique et de l'arginine est typiquement inférieure à 6,6 Å pour avoir une sélectivité plus importante pour l' $\alpha v\beta 3$  25 que pour l' $\alpha IIb\beta 3$  (dont le site est plus large que celui de l' $\alpha v\beta 3$ ). Un acide aminé hydrophobe voisin de l'acide aspartique favorise en outre une meilleure sélectivité. Une telle structure est optimale pour une bonne exposition des fonctions hydrophobes et hydrophiles dans le site du récepteur. Les inventeurs préfèrent en particulier le peptide cyclo(Arg-Gly-Asp-Dphe-Val) aussi noté cyclo(RGDfV), les lettres minuscules indiquent 30 une configuration D de l'acide aminé correspondant. Il présente un IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire (2 – 2,5nM). Ce peptide est particulièrement intéressant pour la fonction amine latérale de la lysine qui peut réagir avec un dérivé FR. Sa synthèse est décrite dans X. Dai, Z. Su, J.O. Liu ; Tetrahedron Letters (2000), 41, pp6295-6298.



### Peptide RGDFK

Il permet le couplage à des chélates Gd FR fonctionnalisés notamment COOH, squarate ou isothiocyanate. Les inventeurs ont eu à surmonter les difficultés techniques liées au choix des protections des acides aminés, au choix du milieu de couplage (solide avec des questions de solubilité des ligands Gd ou en solution).

On pourra utiliser aussi des composés présentant une conformation de flexibilité restreinte, ces peptides ayant une bonne affinité et sélectivité pour  $\alpha\beta 3$ :

-Des peptides dont le motif RGD est placé entre deux cystéines, l'activité pour l' $\alpha\beta 3$  augmentant, par exemple (cyclo(CRGDC)).

-Des peptides dont le groupement RGD n'est pas dans le cycle mais encadré par deux cycles dont au moins l'un d'entre eux était formé par un pont disulfure entre 2 cystéines (WO2/26776)

On pourra utiliser aussi :

-des biovecteurs polypeptides choisis de manière telle qu'ils interagissent *in vivo* avec au moins une enzymes notamment MMP, cette interaction conduisant à une liaison plus forte avec une protéine cible et à une augmentation de la relaxivité, comme décrit dans le document WO 01/52906

-des biovecteurs comprenant un site de clivage enzymatique, le clivage entraînant une modification de conformation et des échanges de molécules d'eau au niveau du chélate FR (principe décrit dans US 5 707 605 avec des chélates non FR).

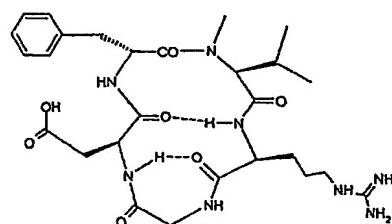
- des biovecteurs dérivés d'anticorps comme le LM609 (Nature Medicine, vol 4, 5, mai 1998, 623)

L'invention concerne aussi des produits BIOVÉCTEURS – FR dont le biovecteur est un peptidomimétique du peptide RGD, approprié pour des applications en oncologie. On pourra utiliser :

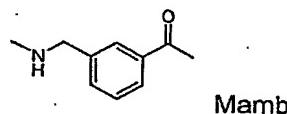
- des peptides avec substitution d'une ou deux liaisons peptidiques par des liaisons thioamides (CSNH) ou par des groupements cétométhylène

(COCH<sub>2</sub>) dans la mesure où les substitutions n'induisent pas de changement de conformation importante.

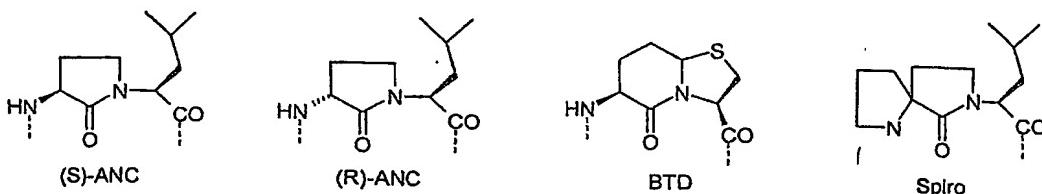
- des peptides (EMD 121974 aussi appelé Cilengitide : cyclo(RGDf-N(Me)V), qui présentent une N-méthylation de chacun des acides aminés du peptide cyclique (RGDFV), ce peptide présentant une très forte affinité ( $IC_{50} = 0,58\text{nM}$ ) et une sélectivité très importante (1500 fois plus importante que pour l' $\alpha IIb\beta 3$ ).



- des peptides possédant la séquence suivante cyclo(Xaa-Yaa-GD-Mamb), le groupement Mamb étant le N-aminomethyl acide benzoïque. Il est démontré que les DXaa-N-MeArg sont des antagonistes très actifs de l' $\alpha IIb\beta 3$  alors que les antagonistes LXaa-Arg sont sélectifs de l' $\alpha v\beta 3$ .



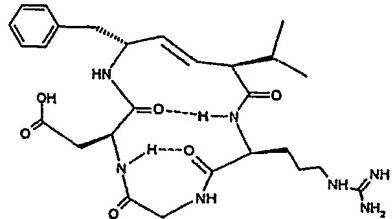
- le peptide cyclique (RGDD(tBuG)Mamb) présentant une affinité très importante pour l' $\alpha v\beta 3$  ( $IC_{50} = 0,6\text{nM}$  contre  $14\mu\text{M}$  pour  $\alpha IIb\beta 3$ ) due au caractère hydrophobe de l'acide aminé voisin de l'acide aspartique et au groupement Mamb qui rend le peptide moins flexible en solution aqueuse
- le peptide XJ735 (DUPONT) possédant le groupement : cyclo(ARGD-Mamb). Celui-ci permet d'inhiber la fixation du fibrinogène au récepteur  $\alpha v\beta 3$  ( $IC_{50} = 70\text{nM}$ ) mais ne bloque pas les autres intégrines ( $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ).
- des peptides obtenus en introduisant différents groupements à la place de Dphe-Val (ou fV) dans le peptide de référence RGDFV.



Ces groupements ont été synthétisés pour mimer le repliement  $\beta II'$  mais aussi pour réduire la flexibilité dans la région de rotation  $\beta$ . L'agent le plus actif

est le cyclo(RGD-(R)-ANC) ( $IC_{50} = 0,8\text{nM}$ ). On peut aussi y introduire des sucres X à la place de ces deux acides aminés (fv) dans la séquence cyclo(RGDX) (Lohof E. et al; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (2000), 39 (15), pp2761-2764)

5 - des peptides avec introduction d'une double liaison dans le cycle (Kawaguchi, et al, Biochemical and Biophysical Research Communications (2001), 288(3), pp711-717)



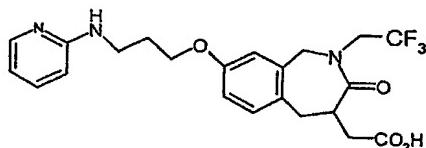
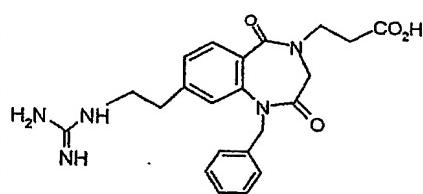
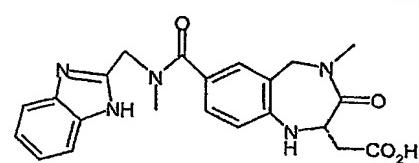
- des peptides décrits dans Chemlibrary.bri.nrc.ca

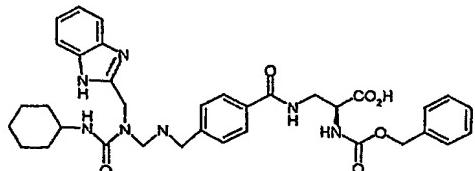
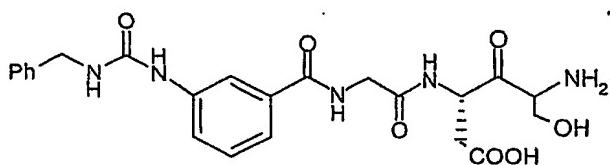
10 L'invention concerne aussi des produits BIOVECTEURS – FR dont le biovecteur est une molécule non peptidique, ciblant l'intégrine  $\alpha v \beta 3$ , appropriée pour des applications en oncologie. On pourra utiliser les composés du tableau suivant, dont l'affinité nanomolaire est démontrée, la partie FR permettant un signal nettement amélioré (l'efficacité diagnostique étant validée par un test de screening tel que celui utilisé pour le peptide RGDFV détaillé plus loin).

15

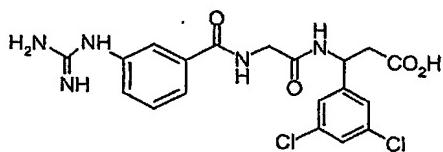
### Composé

#### Benzadiazépine – Benzazépine et dérivés



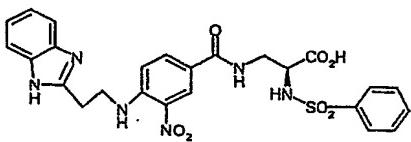
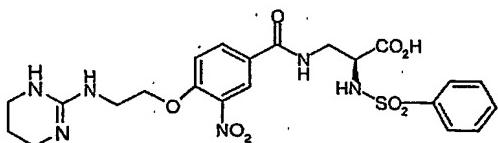
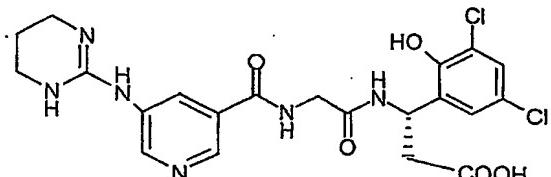
Benzamide

SCH221153



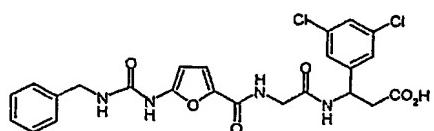
SC 68448

Et autres composés du document WO 01/97861

acylpyridine

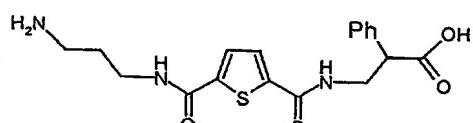
9952896

et autres composés du document WO

Cœur hétéropentacycle

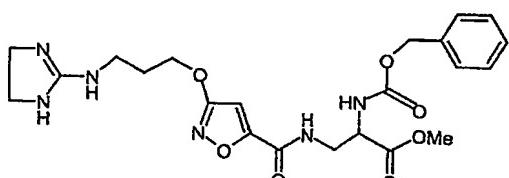
et autres composés du document Lohof et al,

Angew.Chem.Int.Ed.Eng 2000, 39(15), pp2761-2764

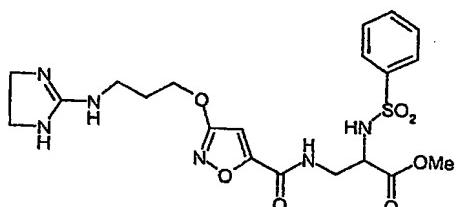


et autres composés à base d'acétylthiophène du

document WO 0000486,

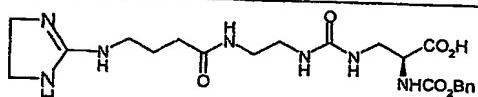
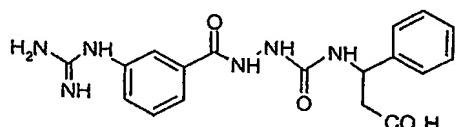


SG 545

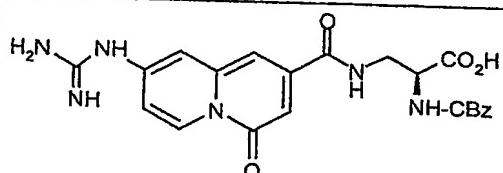


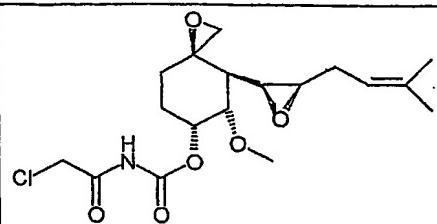
XT 199

(et les composés SG256,SM256,XJ735 de Dupont Pharmaceuticals)

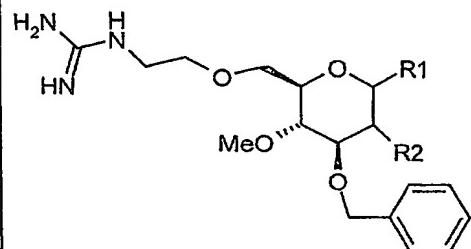


et analogues du document WO 0003973

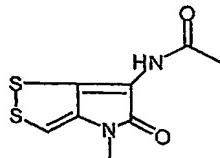




Carbohydrate



Thiolutine



et autres composés à groupe pyrrothine

On pourra utiliser des biovecteurs cités dans les documents US 6 537 520 (biovecteurs ciblant  $\alpha\beta 3$  surexprimé lors de l'angiogenèse) et WO 01/198294 (cœur indazole).

On pourra dans certains cas utiliser plusieurs biovecteurs différents dans un même 5 composé pour augmenter les chances d'atteindre une même cible, par exemple un peptide RGD et une benzadiazépine pour l' $\alpha\beta 3$ .

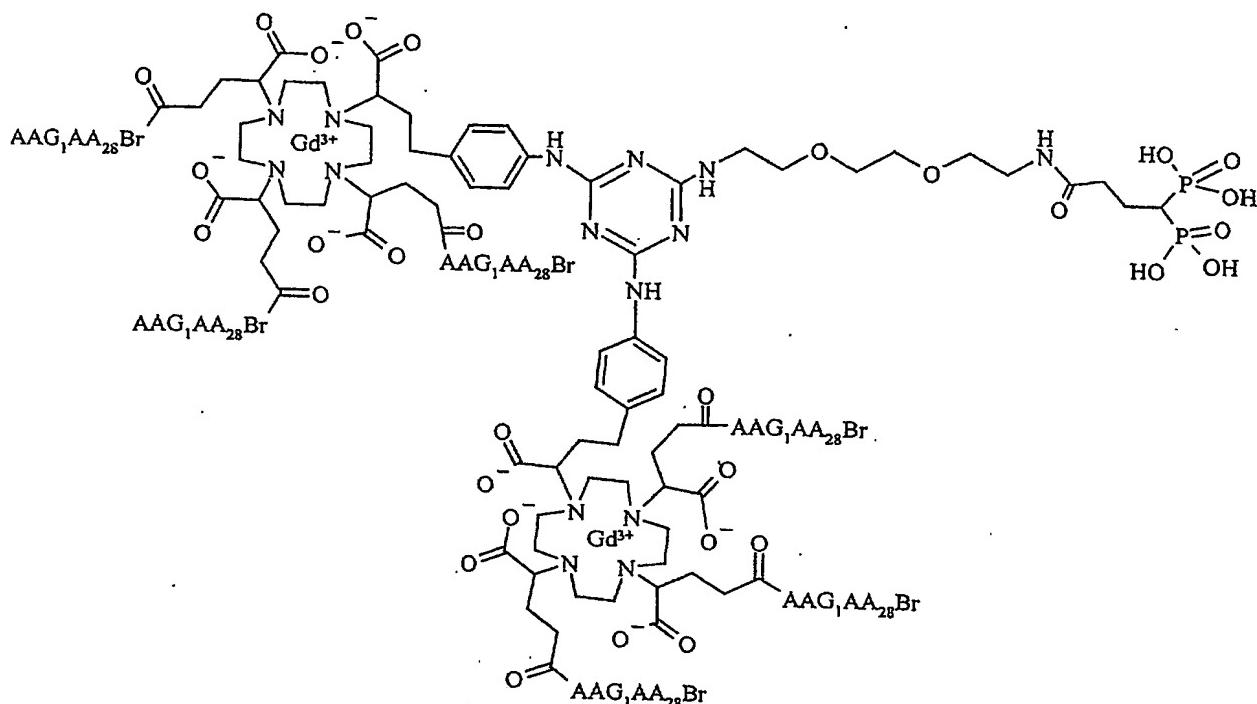
Le principe de la synthèse des biovecteurs-chélates FR avec des inhibiteurs de MMP peut être celui utilisé dans le document WO 01/60416 (pages 91-97) avec des biovecteurs-chélates non FR (dont le biovecteur est désigné Q et le lien Ln).

10 En plus des biovecteurs de type RGD ou équivalents fonctionnels cités ci-dessus, on pourra utiliser les composés inhibiteurs de MMP suivants, sachant que la description détaillée donne des protocoles expérimentaux qui permettent de finaliser un criblage *in vitro* ou *in vivo* :

- des peptides, peptidomimétiques, non peptides fonctionnellement équivalents, efficaces sur le plan diagnostique ou thérapeutique, choisis parmi les inhibiteurs commercialisés, notamment des catalogues 2002 de Bachem, Amersham.
- des inhibiteurs décrits dans les documents WO 01/60416, WO 01/60820, WO 2001/92244, EP 558 635, EP 663 823.

- des inhibiteurs de type hydroxamates, pyrrolidines hydroxamates , hydroxamates bicycliques, cyclobutyl hydroxamates, succinyl hydroxamates, sulfonamides hydroxamates, alanine hydroxamates, tels que décrits dans les documents EP 793 641, EP 766 665, EP 740 655, EP 689 538, EP 575 844, EP 634 998, WO 99/29667, EP 965 592, EP 922 702, WO 99/52889, WO 99/42443, WO 01/60416 (Dupont ; en particulier de formules Ia et Ib).
- des inhibiteurs à base d'acide phosphinique tels que décrits dans les documents EP 725 075, US 5 679 700, WO 98/03516, EP 716 086, WO 2000 74681, WO 2000 04030.
- des inhibiteurs à base d'imides cycliques (US 5 854 275).
- des inhibiteurs à base de sulfonamides tricycliques (WO 2000 06561).
- des inhibiteurs à base d'acide oxobutyrique.
- des dérivés de TIMPS (Bioconjugate Chem, 2001,12,964-971).

15 Toujours dans le domaine oncologie, des composés BIOV рЕCTEURS FR à base de phosphonates ou de bisphophonates sont très utiles pour le cancer des tissus osseux. Ces composés sont aussi utiles pour des maladies associées à des problèmes osseux, dues à des problèmes d'immunité (maladies autoimmunes comme l'arthrite rhumatoïde), à des maladies métaboliques (ostéoporose...), des maladies infectieuses .  
20 Dans ces composés, le biovecteur pourra avoir pour formule  $(PO_3H_2)_n$ , n étant compris typiquement entre 1 et 6, avec [ (BIOV рЕCTEUR) – L] par exemple choisi comme dans le document WO 02/062398. On peut aussi utiliser un bisphosphonate décrit dans les brevets US 6 534 488, US 6 509 324, un bisphosphonate commercialisé tel que étidronate, clodronate, pamidronate, alendronate, ibandronate, YH 592, EB-1053 et analogues.  
25 Les inventeurs ont notamment préparé des produits de formule :



Concernant le domaine des Maladies Inflammatoires et Dégénératives, l'invention vise notamment des biovecteurs FR ciblant des récepteurs localisés sur les macrophages tels que les récepteurs SRA (Scavenger Receptor), les récepteurs Fc (US 2002/58284).

La progression de l'athérosclérose implique la captation des LDL puis leur oxydation au niveau des plaques. La phagocytose de ces LDL oxydées par les macrophages est médiée par un ensemble de récepteurs regroupés sous l'appellation de récepteurs éboueurs ou scavenger (SR). Cette famille de protéines membranaires joue donc un rôle majeur dans la transformation progressive des macrophages en cellules spumeuses. Les SR sont des protéines de surface membranaire capables de fixer les cellules sénescentes ainsi que les lipoprotéines modifiées chimiquement ou biologiquement. Les principaux groupes de SR se classent en différentes classes :

- 1/ Les SR de classe A : type I, type II et MARCO
- 2/ Les SR de classe B : type I, type II et CD36
- 3/ Les SR de classe D : CD68
- 4/ Les SR de classe E et F « lectin-like » : LOX-1
- 5/ Les SR récents non classés : SR-PSOX

Comme rappelé dans le document US A 2002/0127181 et dans De Winther et al., ATVB 2000 20: 290-297; Kunjathoor et al., *J Biol. Chem.* 2002 277: 49982-49988, le récepteur SRA est surexprimé par les macrophages lors de maladies cardiovasculaires (athérosclérose, plaque d'athérome, maladie des artères coronaires, thrombose,

ischémie, infarctus du myocarde ...). L'utilisation de produits selon l'invention pour le ciblage de SRA associé à ces pathologies fait partie de l'invention. On utilisera par exemple comme biovecteur un antagoniste de SRA, avec un métal superparamagnétique pour une étude IRM ou un radioisotope utilisable en scintigraphie ou en 5 tomographie par émission de positrons (PET et techniques dérivées).

L'invention couvre ainsi également, pour le diagnostic et/ou le traitement de maladies inflammatoires, des chélates FR associés :

- 1) à des biovecteurs ciblant le SR, notamment :
  - 1.a) des biovecteurs décrits dans les documents US 6 255 298, US 6 458 845, WO 10 00/06147, WO 00/03704
  - 1.b) des lipoprotéines modifiées notamment des LDL acétylés (acLDL ; Gurudutta et al., *Nucl. Med. Biol.* 2001 28: 235-24) et des LDL oxides (oxLDL)
  - 1.c) des ligands AcLDL, OxLDL, LPS décrits dans Esbach et al., *Hepatology*. 1993 18: 15 537; De Rijke et al., *J.Biol.Chem* 1994 269: 824; Van Oosten et al., *Infect. Immun.* 1998 66: 5107; Bijsterbosch et al *Nucleic Acids Res.* 1997 25: 3290; Biessen et al, *Mol.Pharmacol.* 53: 262, 1998
  - 1.d) des peptides criblés par phage display capables de se lier au récepteur SR-AI ;
- 20 2) à des biovecteurs ciblant des récepteurs aux folates (ces récepteurs aux folates sont surexprimés dans les macrophages activés) pour une utilisation dans des pathologies impliquant une activation de macrophages ;
- 25 3) à des peptides de ciblage de plaques amyloïdes entraînant notamment la maladie d'Alzheimer (par exemple décrits dans WO 01/74374, US 6 329 531) ;
- 4) à des biovecteurs de type CSF (GCSF, GM-CSF...) décrits par exemple dans le brevet US 6 491 893 ;
- 30 5) à des anticorps ou des fragments d'anticorps ciblant des récepteurs surexprimés sur les macrophages (CD68, MRP6-18, ...)

Dans le domaine des maladies inflammatoires, les inventeurs ont en outre obtenu des BIOVÉCTEURS FR dont le biovecteur est la phosphatidylsérine ou un dérivé de la

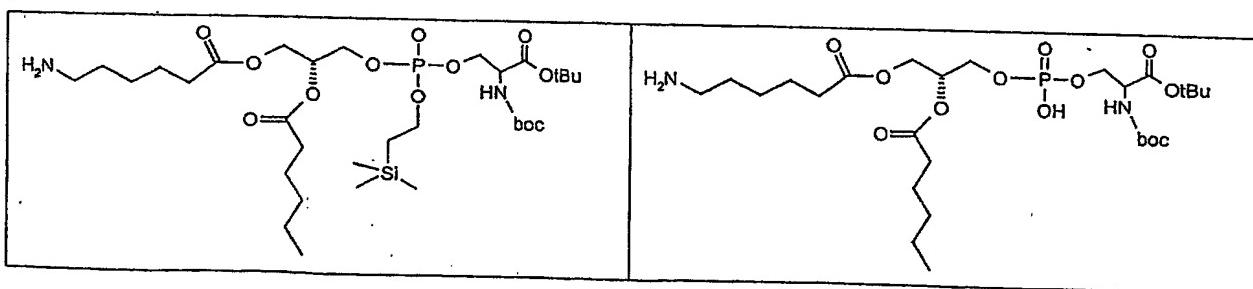
phosphatidylsérine, pour une utilisation dans le diagnostic de maladies liées aux macrophages.

La phosphatidylsérine (PS) est un phospholipide membranaire, principalement localisé sur la face interne de la cellule côté cytoplasmique. Sa charge globale négative stabilise

5 sa polarité et l'empêche de diffuser au travers de la membrane plasmique. La PS sert de signal de reconnaissance pour le macrophage. La nature de ce signal reste encore inconnue (reconnaissance directe, densité de charges, récepteurs multiples, récepteur unique inductible). D'après les derniers travaux publiés, il s'agirait d'une interaction directe PS et récepteur à la PS (PSR) après induction de ce récepteur à la surface de  
10 certains macrophages présents dans la zone en rupture d'homéostasie. Chez certaines cellules macrophagiques, la PS interagit également avec les scavengers récepteurs via leur site d'attache pour les phospholipides anioniques. La PS est exprimée au niveau de la face interne de la membrane de toutes les cellules viables. En cas de souffrance cellulaire ou en début de processus apoptotique, une translocase membranaire provoque un basculement de la PS sur la face extracellulaire de la cellule. Cette  
15 expression extracellulaire constitue un signal de reconnaissance pour les macrophages qui reconnaissent et phagocytent la cellule en souffrance évitant ainsi une inflammation locale.

Les inventeurs ont préparé un agent de contraste lié à la PS ou dérivé, destiné à être  
20 activement capté par les macrophages afin d'imager ces diverses pathologies.

Plusieurs difficultés techniques chimiques ont été surmontées, afin de préparer les biovecteurs PS suivants, le chélate étant couplé sur la fonction NH<sub>2</sub> libre :



25 Afin de contrôler parfaitement la structure des produits finaux, il a été nécessaire de préparer des dérivés de PS correctement fonctionnalisés (nature de la fonction engagée dans la réaction de couplage avec le chélate FR, emplacement de celle-ci sur la molécule de PS). Les fonctions chimiques retenues sont adaptées pour permettre l'ancre du phospholipide à la sonde paramagnétique de manière sélective et efficace.

La présence d'un résidu amino-acide sur la partie polaire de la PS est une source de difficultés supplémentaires qu'il a fallu gérer en pratiquant une chimie de protection/déprotection des fonctions amine et acide libres et/ou en utilisant des méthodes chimiques compatibles avec ces fonctions.

5 Les groupes protecteurs du résidu amino-acide sont les groupements classiques utilisés en chimie des amino-acides ( Boc, tBu, Z, Bn...). Les fonctions préférées pour assurer la liaison entre la PS et la sonde paramagnétique sont NH<sub>2</sub>, COOH, SH.

10 Les inventeurs ont en outre préparé des produits vectorisés dans lesquels la phosphatidylsérine est dépourvue d'au moins une des chaînes grasses, l'affinité n'étant pas altérée de manière gênante.

En plus de tous les exemples décrits précédemment, l'invention couvre de manière générale des composés BIOVÉCTEURS FR, efficaces sur le plan diagnostique ou thérapeutique, comprenant en association au moins un dérivé FR avec au moins un biovecteur capable de cibler un ligand associé à (intervenant directement ou indirectement et/ou surexprimés dans) un processus pathologique. On entend par efficaces sur le plan diagnostique le fait que le composé FR n'a pas perdu de manière gênante sa sélectivité par rapport au composé non FR correspondant et que sa relaxivité est suffisamment élevée pour permettre une amélioration significative du diagnostic par rapport aux composés connus, avec une relaxivité r<sub>1</sub> par Gd du composé typiquement d'au moins 20, de préférence d'au moins 30,35,40 mMol<sup>-1</sup>Gd<sup>-1</sup>. L'homme du métier grâce à la présente demande, dispose des techniques appropriées pour tester cette efficacité diagnostique.

25 Parmi les biovecteurs on citera notamment, en plus de ceux déjà cités plus haut dans la présent demande :

- 1) Les biovecteurs décrits dans les documents WO 01/97850 (ciblant des récepteurs VEGF et angiopoïétine), US 6 372 194 (polymère tel que polyhystidine), WO 2001/9188 (polypeptide ciblant la fibrine), WO 01/77145 (peptide de cibage d'intégrines), WO 02 26776 (peptide de ciblage d'intégrine αvβ3), WO 99/40947 (peptides ciblant par exemple le récepteur KDR/Flik-I dont R-X-K-X-H et R-X-K-X-H, ou les récepteurs Tie-1 et 2), WO 02062810 (glycosides de sialyl Lewis), WO 02/40060 (antioxydants tels que l'acide ascorbique), US 6 524 554 (ciblage de la tuftsin), WO 02/094873 (ciblage de récepteurs à protéine G GPCR en particulier la cholécystokinine), US 6 489 333 (association antagoniste d'intégrine et mime de la guanidine), US 6 511 648 (quinolone

ciblant  $\alpha v\beta 3$  ou 5), US A 2002/0106325, WO01/97861 (benzodiazépines et analogues ciblant des intégrines), WO 01/98294 (imidazoles et analogues), WO 01/60416 (inhibiteurs de MMP, notamment des hydroxamates), WO 02/081497 (peptides de ciblage d' $\alpha v\beta 3$  tels que RGDWXE), WO 01/10450 (peptides RGD), US 6 261 535 (anticorps ou fragments d'anticorps (FGF, TGFb, GV39, GV97, ELAM, VCAM, inducible par TNF ou IL), US 5 707 605 (molécule de ciblage modifiée par interaction avec sa cible), WO 02/28441 (agents de ciblage de dépôts amyloïdes), WO 02/056670 (peptides clivés cathepsines), US 6 410 695 (mitoxantrone ou quinone), US 6 391 280 (polypeptides ciblant des cellules épithéliales), US 6 491 893 (GCSF), US 2002/0128553, WO 02/054088, WO 02/32292, WO 02/38546, WO20036059, US 6 534 038, WO 99/54317 (inhibiteurs de cystéines protéases), WO 0177102, EP 1 121 377, Pharmacological Reviews (52,n°2, 179 ; facteurs de croissance PDGF, EGF, FGF, ...), Topics in Current Chemistry (222, W.Krause, Springer), Bioorganic & Medicinal Chemistry (11, 2003, 1319-1341 ; dérivés tétrahydrobenzazépinones ciblant  $\alpha v\beta 3$ ).

15 2) Les inhibiteurs d'angiogenèse, notamment ceux testés en essais cliniques ou déjà commercialisés, notamment :

- les inhibiteurs d'angiogenèse impliquant des récepteurs FGFR ou VEGFR tels que SU101, SU5416, SU6668, ZD4190, PTK787, ZK225846, des composés azacycles (WO 00244156, WO 02059110) ;

20 - les inhibiteurs d'angiogenèse impliquant des MMP tels que le BB25-16 (marimastat), le AG3340 (prinomastat), le solimastat, le BAY12-9566, le BMS275291, le metastat, le neovastat ;

25 - les inhibiteurs d'angiogenèse impliquant des intégrines tels que le SM256, le SG545, des molécules d'adhésion bloquant le EC-ECM (tels que le EMD 121-974, ou la vitaxine) ;

30 - des médicaments à mécanisme d'action antiangiogenèse plus indirect tels que le carboxiamidotriazole, le TNP470, la squalamine, le ZD0101 ;

- les inhibiteurs décrits dans le document WO 99/40947 , les anticorps monoclonaux très sélectifs pour la liaison au récepteur KDR, les analogues de la somatostatine (WO 94/00489), les peptides de liaison à la sélectine (WO 94/05269), des facteurs de croissance (VEGF, EGF, PDGF, TNF, MCSF, interleukines); des biovecteurs de ciblage de VEGF décrits dans Nuclear Medicine Communications ,1999, 20 ;

  - les peptides inhibiteurs du document WO 02/066512.

- 3) Des biovecteurs capables de cibler des récepteurs : CD36, EPAS-1, ARNT, NHE3, Tie-1, 1/KDR, Flt-1, Tek, neuropiline-1, endogline, pléiotropine, endosialine, Axl., alPi, a2ssl, a4P1, a5pl, eph B4 (éphrine), récepteur laminine A, récepteur neutrophilin 65, récepteur leptine OB-RP, récepteur chimiochrome CXCR-4 (et autres récepteurs cités dans le document WO99/40947), LHRH, bombésine/GRP, récepteurs gastrine, VIP, CCK.
- 5 4) Des biovecteurs de type inhibiteurs de tyrosine kinase.
- 5 5) Les inhibiteurs du récepteur GPIIb/IIIa connus choisis parmi : (1) le fragment fab d'un anticorps monoclonal du récepteur GPIIb/IIIa, Abciximab (ReoPro™), (2) les petites molécules peptidiques et peptidomimétiques injectées en intraveineuse telles que l'eltefibrate (Integrilin™) et le tirofiban (Aggrastat™).
- 10 6) Des peptides antagonistes de récepteurs au fibrinogène (EP 425 212), des peptides ligands de récepteurs IIb/IIIa, des ligands du fibrinogène, des ligands de la thrombine, des peptides capables de cibler la plaque d'athérome, les plaquettes, la fibrine, des peptides à base d'hirudine, des dérivés à base de guanine ciblant le récepteur IIb/IIIa.
- 15 7) D'autres biovecteurs ou fragments biologiquement actifs de biovecteurs connus de l'homme du métier comme médicaments, à action anti-thrombotique, anti agrégation plaquettai, antiathérosclérotique, antiresténotique, anticoagulante.
- 8) D'autres biovecteurs ou fragments biologiquement actifs de biovecteurs ciblant  $\alpha v \beta 3$ , décrits en association avec des DOTA non FR dans le brevet US 6 537 520, choisis parmi les suivants : mitomycine, tretinoïne, ribomustine, gemcitabine, vincristine, etoposide, cladribine, mitobronitol, methotrexate, doxorubicine, carboquone, pentostatine, nitracrine, zinostatine, cetrorelix, letrozole, raloxifene, daunorubicine, fadrozole, fotemustine, thymalfasin, sobuzoxane, nedaplatin, cytarabine, bicalutamide, vinorelbine, vesnarinone, aminoglutethimide, amsacrine, proglumide, elliptinium acetate, ketanserin, doxifluridine, etretinate, isotretinoïne, streptozocine, nimustine, vindesine, flutamide, drogenil, butocin, carmofur, razoxane, sizofilan, carboplatine, mitolactol, tegafur, ifosfamide, prednimustine, picibanil, levamisole, teniposide, imrosulfan, enocitabine, lisuride, oxymetholone, tamoxifen, progesterone, mepitiostane, epitostanol, formestane, interferon-alpha, interferon-2 alpha, interferon-beta, interferon-gamma, colony stimulating factor-1, colony stimulating factor-2, denileukin diftitox, interleukin-2, leutinizing hormone releasing factor.
- 20 9) certains biovecteurs ciblant des types particuliers de cancers, par exemple des peptides ciblant le récepteur ST associé au cancer colo-rectal, ou le récepteur tachykinine.

- 10) des biovecteurs utilisant des composés de type phosphines.
- 11) des biovecteurs de ciblage de P-sélectine, E-sélectine (par exemple le peptide de 8 acides aminés décrit par Morikawa et al, 1996, 951).
- 12) l'annexine V ou des biovecteurs ciblant les processus apoptotiques.
- 5 13) tout peptide obtenu par des technologies de ciblage telles que le phage display, modifié éventuellement par des acides aminés non naturels (<http://chemlibrary.bri.nrc.ca>), par exemple des peptides issus de banques phage display : RGD, NGR, CRRETAWAC, KGD, RGD-4C, XXXY\*XXX, RPLPP, APPLPPR.
- 10 14) d'autres biovecteurs peptidiques connus de ciblage de plaques d'athérome cités notamment dans le document WO 2003/014145.
- 15 15) des vitamines.
- 16) des ligands de récepteurs hormonaux dont les hormones et les stéroïdes.
- 17) des biovecteurs ciblant des récepteurs opioïdes.
- 18) des biovecteurs ciblant des récepteurs TKI.
- 15 19) des antagonistes LB4 et VnR.
- 20) des composés nitriimidazoles et benzylguanidines..
- 21) des biovecteurs rappelés dans Topics in Current Chemistry, vol.222, 260-274, fundamentals of receptor-based diagnostic metallopharmaceuticals, notamment :
  - des biovecteurs de ciblage de récepteurs peptidiques surexprimés dans les tumeurs (récepteurs LHRH, bombésine/GRP, récepteurs VIP, récepteurs CCK, récepteurs tachykinine par exemple), notamment les analogues de somatostatine ou de bombésine, des peptides dérivés octréotide éventuellement glycosylés, les peptides VIP, les alpha-MSH, les peptides CCK-B
  - des peptides choisis parmi : des peptides cycliques RGD, fibrine-chaîne alpha, CSVTCR, tuftsin, fMLF, YIGSR (récepteur : laminine)
- 25 22) des polysaccharides et des dérivés d'oses, des dérivés ciblant Glu.
- 23) des biovecteurs utilisés pour des produits de type smart.
- 24) des marqueurs de la viabilité myocardique (tétrofosmine et hexakis2métoxy-2méthylpropylisonitrile).
- 30 25) des traceurs du métabolisme des sucres et des graisses.
- 26) des ligands de récepteurs de neurotransmetteurs (récepteurs D,5HT,Ach,GABA,NA).
- 27) des oligonucléotides.

De manière préférée, les biovecteurs utilisés auront des cibles membranaires, mais on pourra aussi utiliser des biovecteurs à cible intracellulaire, par exemple des activateurs de récepteurs PPAR (Peroxisomal Proliferator-Activated Receptors) connus pour réduire les risques de thrombose due à l'altération des plaques, et dont certains sont d'ailleurs connus pour réduire la production de MMP. On pourra aussi cibler des protéases ou des composants extracellulaires présents à la surface ou dans les tissus sains ou pathologiques

L'homme du métier, grâce à l'enseignement de la présente demande (tests d'activité présentés) et aux techniques connues de screening de l'art antérieur (par exemple méthodes décrites dans le document WO 02/087632, test CEREP 80), sait cribler l'efficacité diagnostique ou thérapeutique de ces composés BIOV рЕCTEURS FR (en particulier utilisant des biovecteurs décrits dans les brevets correspondants aux biovecteurs cités ci-dessus).

15 Les produits biovecteurs-FR de la présente invention sont donc différents de produits qui associent ou qui pourraient associer :

- a) d'une part des chélates à faible relaxivité (squelette DTPA, DOTA, DO3A, BOPTA ...) ou à relaxivité  $r_1$  et/ou  $r_2$  d'au moins 20,30,35,40,50,60,70,100,150 mMol-Gd-1 (des polymères, des dendrimères de génération 2 à 5, des chélates en réseau par exemple avec cyclodextrines...), notamment les dérivés non FR cités au début de la présente demande (et des composés issus de ces dérivés non FR pour augmenter leur relaxivité par exemple par association, polymérisation, réticulation, greffage sur des sucres, sur des molécules peptidiques ou protéiques, des liposomes, des micelles, des polymères),
- b) et d'autre part tout biovecteur associé à des processus pathologiques cité dans la demande.

30 L'invention concerne selon un autre aspect les produits de contraste pour l'IRM comprenant un composé BIOV рЕCTEUR FR tel que décrit précédemment dont l'ion de métal paramagnétique est de nombre atomique 21-29, 42-44 ou 58,70, de préférence de gadolinium.

35 L'invention concerne selon un autre aspect les produits de contraste pour l'imagerie aux rayons X ou à la CT, comprenant un composé BIOV рЕCTEUR FR tel que décrit précédemment dont l'ion de métal lourd est de nombre atomique 21-31, 39-50 , 56-80, 82, 83 ou 90.

- L'invention concerne selon un autre aspect des produits radiopharmaceutiques, comprenant un composé BIOVECTEUR FR tel que décrit précédemment dont le chélate FR est chélaté avec un radionucléide ou un radiohalogène connu de l'homme du métier, typiquement le Gadolinium, le technecium, le chrome, le gallium, l'indium, l'ytterbium, le rhénium, le lanthanum, l'yttrium, le dysprosium, le cuivre ou analogue. On pourra aussi préparer des composés radiopharmaceutiques utilisant une technique de type PET avec du  $^{18}\text{F}$  (Vaidyanathan, G. and Zalutsky, M. R. *Bioconjugate Chem.* 1990, 1, 269-273; Vaidyanathan, G. and Zalutsky, M. R. *Nucl. Med. Biol.* 1992, 19, 275-281; Vaidyanathan, G. and Zalutsky, M. R. *Bioconjugate Chem.* 1994, 5, 352-364; 5 Vaidyanathan, G. and Zalutsky, M. R. *Nucl. Med. Biol.* 1995, 22, 759-764; Sutcliffe-Goulden et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 1501-1503).
- 10 L'invention concerne selon un autre aspect une méthode de diagnostique et une méthode de traitement radiopharmaceutique utilisant un produit tel que décrit précédemment.
- 15 L'invention concerne selon un autre aspect l'utilisation d'un produit tel que décrit précédemment pour la préparation d'une composition diagnostique ou radiopharmaceutique. Les compositions diagnostiques et radiopharmaceutiques selon l'invention peuvent être utilisées comme décrit dans les demandes US 2002/0090342, US 2002/0098149, WO 02/055111 pour des indications anticancéreuses.
- 20 Pour un diagnostic en IRM, l'administration intraveineuse par injection habituellement en solution saline, se fait typiquement à une dose de 1 à 500  $\mu\text{mol Gd/kg}$ . Pour un diagnostic radiopharmaceutique, l'administration intraveineuse par injection habituellement en solution saline, se fait typiquement à une dose de 1 à 100 mCi pour 70 kg de poids corporel, de préférence de 5 à 50 mCi.
- 25 Pour une utilisation comme agents de contraste aux rayons X, la concentration en atome lourd est typiquement de 0.1 M à 5 M, avec des concentrations par administration intraveineuse de l'ordre de 0.5 à 1.5 mmol/kg.
- 30 L'invention concerne selon un autre aspect l'utilisation d'un chélate FR tel que décrit précédemment pour la préparation d'une composition destinée à de l'imagerie optique. L'invention concerne aussi une méthode d'imagerie comprenant la synthèse d'un composé comprenant un métal paramagnétique selon l'invention, capable de cibler une zone pathologique, son administration à un patient, l'imagerie par IRM. L'invention concerne aussi une méthode d'imagerie comprenant la synthèse d'un composé radiopharmaceutique selon l'invention, capable de cibler une zone pathologique, son

administration à un patient, l'imagerie par scintigraphie gamma SPECT ou planaire, ou tomographie par émission de positrons.

### DEFINITIONS

- 5 Le terme "sel", est défini par exemple dans CRC Handbook of Chemistry and Physics, 65th Edition, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1984. Le terme sel pharmaceutiquement acceptable fait référence à des dérivés des composés selon l'invention modifiés en faisant des sels acides ou basiques, par exemple des sels minéraux ou organiques, des sels acides de résidus basiques tels que des amines, des sels alcalins de résidus acides tels que des acides carboxyliques (exemples de sels : hydrochlorique, hydrobromique, sulfurique, sulfamique, acétique, propionique, succinique, stéarique, lactique, malique, tartrique, citrique, glutamique), des sels de méglumine ou de lysine notamment.

10 Une dose pharmaceutiquement acceptable fait référence à une dose appropriée pour une utilisation thérapeutique ou diagnostique.

15 Le terme alkyle inclut les groupes hydrocarbone aliphatiques saturés ou insaturés Les C1-Cn alkyles incluent les groupes alkyles en C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, ...Cn, par exemple : méthyle, éthyle, n-propyle, i-propyle, n-butyle, s-butyle, t-butyle, n-pentyle. Des exemples d'haloalkyle incluent les trifluorométhyle, trichlorométhyle, pentafluoroéthyle.

20 Le terme "alcanoyle" inclut notamment : formyle, alkyle tel que défini ci-dessus substitué en terminal par un carbonyle, par exemple acétyle, propanoyle, butanoyle, pentanoyle et analogues.

25 Le terme "alcényle" fait référence à des chaînes carbonées linéaires ou ramifiées avec au moins une double liaison carbone-carbone.

Le terme "arylalkyle" fait référence

Le terme "alcynyle" fait référence à des chaînes carbonées linéaires ou ramifiées avec au moins une triple liaison carbone-carbone.

30 Le terme "alkylamino" fait référence à des alkyles substitués par N, incluant des monoalkylamino (méthylamino, éthylamino, propylamino, tert-butylamino...) et des dialkylamino (diméthylamino, diéthylamino, méthylpropylamino...).

Le terme "halo" fait référence à des éléments du groupe 17 notamment fluoro, chloro, bromo, iodo.

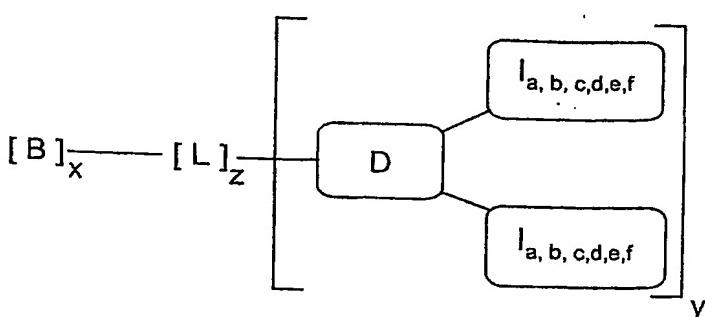
Le terme "alkylène" fait référence à des chaînes carbonées linéaires ou ramifiées

telles que méthylène, éthylène, 2méthylpropylène. Le terme poloxyalkylène fait référence à des composés tels que le polyoxyéthylène ou le polyoxypropylène.

Le terme "acides aminés naturels" fait référence aux 20 aminoacides intervenant dans la synthèse des protéines, tels que la glycine, alanine, méthionine.

- 5 Les alkkoxy incluent notamment : méthoxy, éthoxy, n-propoxy, i-propoxy, n-butoxy, s-butoxy, t-butoxy, n-pentoxy, s-pentoxy. Les cycloalkyles incluent notamment : cyclopropyle, cyclobutyle, cyclopentyle. Les "carbocycles" incluent les monocycles, bicycles ou tricycles, chaque cycle étant partiellement insaturé ou aromatique, notamment : cyclopropyle, cyclobutyle, cyclopentyle, cyclohexyle, cycloheptyle,
- 10 adamantyle, cyclooctyle, [3.3.0]bicyclooctane, [4.3.0]bicyclononane, [4.4.0]bicyclic-decane, [2.2.2]bicyclooctane, fluorényle, phényle, naphthyle, indanyle, adamantyle, Les alkarylés incluent notamment les groupes aryle portant un groupe alkyle de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 atomes de carbone. Les aralkyles incluent les groupes alkyle de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 atomes de carbone portant un groupe aryle.
- 15 Les hétérocycloalkyles incluent notamment les groupes alkyle de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 atomes de carbone portant un hétérocycle. Les hétérocycles monocycliques stables de 5, 6, ou 7 membres peuvent être saturés, partiellement insaturés ou insaturés, et comprennent des atomes de carbone et 1, 2, 3, ou 4 hétéroatomes choisis parmi N, NH, O, S. Ces hétérocycles peuvent être aromatiques. Les hétérocycles incluent notamment ceux cités dans le brevet US 6 537 520, notamment : pyridinyle, furinyle, thienyle, pyrrolyle, pyrazolyde, pyrrolidinyle, imidazolyde, indolyle, benzimidazolyde, 1H-indazolyde, oxazolidinyle, benzotriazolyde, benzisoxazolyde, oxindolyle, benzoxazolinyle, isatinoyde.
- 20 L'invention couvre sauf indication contraire, toutes les formes chirales, diastéréoisomères, racémiques, notamment cis-trans, L-D des composés décrits.

On décrit maintenant des exemples de composés obtenus par les inventeurs. On décrira en particulier des composés polymétalliques de formule



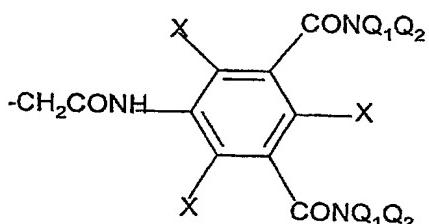
Il est clair que des composés monométalliques ont été également obtenus par les inventeurs à l'aide de "briques" analogues ou identiques de celles utilisées pour les polymétalliques.

Les exemples 1 à 10 décrivent la partie signal Ch FR couplée avec un lien L le cas échéant. On précise :

- D'=D-H avec D radical faisant partie de (E) et D' l'intermédiaire de même formule avec la fonction amine libre
  - la signification des branches AAG1AA28BR et AAG1 AA29 Br

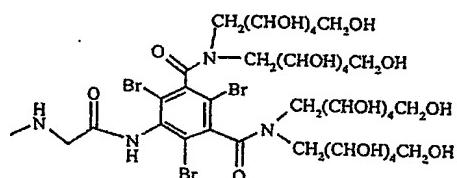
La branche AAG1AA28BR a pour formule :

10



avec  $Q_1 = Q_2 = \text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$  et  $X = \text{Br}$

R1 représente donc :



15

La branche dite AAG1 AA29 Br a pour formule :

avec  $Q_1 = \text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$  et  $Q_2 = \text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$  et  $x = \text{Br}$

Les exemples 12 à 16 décrivent la partie biovecteur : dérivés folates (exemple 11), dérivés de la PS (exemples 12,13), peptides (exemple 23).

Les colonnes HPLC ont les caractéristiques suivantes :

Superspher 60A RP-SELECT B® 4µm, (125 x 4.6 mm) ( Merck®)

Symmetry® C18 100 Å ; 5 µm ; (250 x 4.6 mm) ( Waters®)

Symmetry® C18 5µ, 100 Å (100 x 4.6 mm) ( Waters®)

HyperCarb® 5 µm 250 Å ; (250 x 4.6 mm) ( hypersil®)

X-TERRA MS® C18 5µ, (250 x 4.6 mm) ( Waters®)

Licrospher® RP18 100 Å, 5 µm, (250x4.6)( Merck®).

CES (chromatographie d'exclusion stérique) :

Effectuée sur une succession de 4 colonnes ( $d = 8$  mm,  $l = 30$  cm) commercialisées

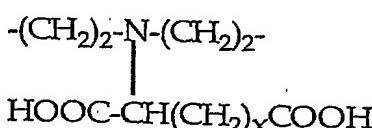
par Shodex® (JP) sous les références OH Pack SB-HQ, contenant du gel de polyhydroxyméthacrylate, dont les limites d'exclusion, déterminées avec du Pullulan® sont successivement :  $10^6$  KD (SB-804) ;  $10^5$  KD (SB-803) ;  $10^4$  KD (SB-802.5) ;  $10^4$  KD (SB 802.5) ; éluant : solution aqueuse NaCl (0,16M)/CH<sub>3</sub>CN 70/30 v/v, debit 0,8 ml/min. T = 30° C :

15

### EXEMPLE 1

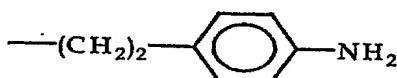
Composés de formule V où  $x = 2$ ,

et  $-S_1-T'-S_2-$  est, avec  $S_1 = S_2 = (CH_2)_2$ ,



20

tandis que  $Z_1$  est



et  $Z_2$  est  $-(CH_2)_2-COOH$

a)

25 A une suspension de 20 g de 1,4,7,10-tétraazacyclododécane dans 140 ml de CH<sub>3</sub>CN, on ajoute goutte à goutte 40,4 g de 2-bromo-4-(4-nitrophényl)butyrate de méthyle en solution dans 50 ml de CH<sub>3</sub>CN. Après agitation 24 h à 25° C, la solution est filtrée, lavée par CH<sub>3</sub>CN, puis par 200 ml d'éther diéthylique. Après filtration, le produit sous forme de bromhydrate est recristallisé dans 200 ml de CH<sub>3</sub>CN. m = 42 g ; F = 170° C.

30

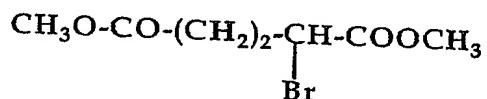
HPLC :

Colonne Lichrospher C18®

eau-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01M / CH<sub>3</sub>CN

tr : 2.5 min

b) Réaction avec Y'''Br =



5

Une suspension contenant 20 g du composé obtenu à l'étape a) et 20 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans 400 ml de CH<sub>3</sub>CN est portée à température de reflux durant 15 min avant de rajouter goutte à goutte 40 g de 2-bromoglutarate de méthyle. Après agitation 24 h à reflux puis une nuit à 25° C, le milieu est filtré puis le solvant est évaporé et le résidu est dissous dans 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique est lavée à l'eau puis séchée sur sulfate de sodium avant l'élimination du solvant par évaporation sous pression réduite. Le résidu est dissous dans un volume minimum de solution aqueuse d'HCl 1M. Cette solution est lavée par un même volume d'éther diéthylique puis amenée à pH 4 par NaHCO<sub>3</sub> avant d'être extraite par de l'éther diéthylique. Après évaporation de la phase organique, le résidu est purifié par chromatographie sur silice (Merck® Si 60) en éluant avec un mélange heptane/CH<sub>3</sub>COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (40/60 v/v puis 30/70 v/v) ; m = 8 g.

HPLC :

Colonne Symmetry® C18 ; eau-TFA pH 3 / CH<sub>3</sub>CN ; tr : 22 -29min

20 c) Hydrolyse des groupes esters de méthyle

10 g du composé obtenu selon l'étape b) sont dissous dans 20 ml d'une solution aqueuse d'HCl 12N et le mélange est porté à reflux pendant 24 h. Après refroidissement, la solution est évaporée et la résidu dissous dans l'eau. Après concentration sous vide, on obtient 7,7 g de produit brut.

25

d) Complexation du gadolinium avec le composé précédent

La solution de 5 g du produit brut précédent dans 30 ml d'H<sub>2</sub>O est amenée à pH 5,2 par addition de NaOH 5M avant d'ajouter 1,2 g de Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Le milieu est chauffé à 80° C durant 2 h 30 pendant lesquelles le pH est maintenu entre 5,2 et 5,5 par addition d'une solution aqueuse d'HCl 6M. Après refroidissement à 25° C, le milieu est versé sur 250 ml de C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH à 10° C. Le précipité obtenu après lavage à C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH est séché ; m = 5 g.

HPLC :

Colonne Symmetry® C18 ; eau-TFA pH 2.8 / CH<sub>3</sub>CN ; tr : 31 -34min

e) Réduction du groupe nitro

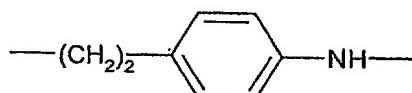
5 g du complexe de gadolinium sous forme de sel de sodium sont dissous dans 70 ml d'eau et hydrogénés sous pression (charbon palladié à 10%, 25° C sous une pression d'hydrogène de  $3 \cdot 10^5$  Pa pendant 6 h.) On obtient 5 g de produit sous forme de sel de sodium.

HPLC : Colonne Symmetry® C18 ; eau-TFA pH 2.8 / CH<sub>3</sub>CN ; tr : 17 – 21 min

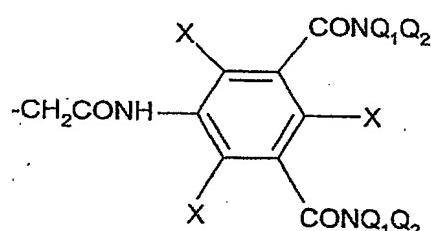
EXEMPLE 2

Composé de formule : II'₂ avec x = 2

10 -GNH- est



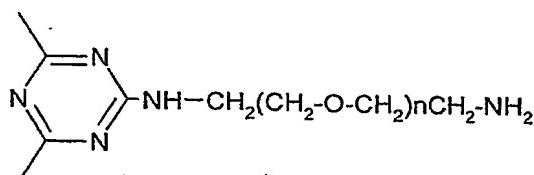
R est



avec Q<sub>1</sub> = Q<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>(CHOH)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>OH et X = Br

15

D' est



avec n=2

20 a) condensation sur le cycle triazine

A une solution de 7,6 g du composé de l'étape e) exemple 1 dans 75 ml d'eau en présence de NaHCO<sub>3</sub> de pH = 7,7 est ajoutée, sous agitation, une solution de 0,66 g de 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine dans 9 ml de dioxane. Après 6 h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est stocké la nuit à 4°C.

25 Spectre de masse : Mode ES<sup>+</sup> m/z = 950 avec z = 2

HPLC : Colonne Symmetry® C18 ; eau-TFA pH 3 / CH<sub>3</sub>CN;tr : 41 min

b) couplage de l'amine R-NH<sub>2</sub>

- A température ambiante et sous bonne agitation, on ajoute à la solution de l' étape a), 5 30,06 g d'amine R-NH<sub>2</sub>, pH = 6,65. On ajoute 0,2 ml d'HCl 6N pour obtenir un pH = 6,2. 0,47 g de NHS puis 5,8 g d'EDCI sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel. Après 3 h d'agitation à température ambiante on ajoute un volume d'eau au milieu réactionnel, puis on ultrafiltre sur une membrane en polyéther sulfone (Pall®) avec un seuil de coupure de 1 KD, le rétentat est évaporé jusqu'à un volume de 100 ml, puis versé sur 10 1000 ml d'EtOH à froid. Le précipité formé est isolé. Masse obtenue = 29 g.

Spectre de masse :Mode ES<sup>-</sup> m/z = 2141,6 avec z = 4

HPLC : Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 2.8 / CH<sub>3</sub>CN;tr : 22 min

c) introduction de la diamine

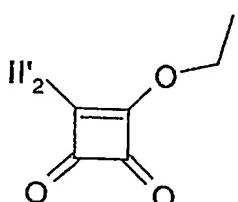
- 15 45 ml de 2-2'-(Ethylène dioxy)bis éthylamine sont dilués dans 173 ml de DMSO à 65°C.L'intermédiaire précédemment préparé est ajouté. Après 1 h d'agitation à 65°C et 1 h à température ambiante, le milieu réactionnel est versé dans 1730 ml d'éthanol. Le précipité obtenu est filtré et lavé à l'éthanol. Le produit obtenu est redissous dans 750 ml d'eau pour être purifié par ultrafiltration sur une membrane avec un seuil de coupure de 1 KD.

Spectre de masse :Mode ES<sup>-</sup> m/z = 1735.2 avec z = 5

HPLC : Colonne Licrosphère® RP18;eau / CH<sub>3</sub>CN;tr : 21 min

EXEMPLE 3

- 25 Composé de formule :



Avec : x, -GNH-, R, Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub>, X, D' et n tels que définis exemple 2 et D-H= D' .

- 30 1.38g (1.59\*10<sup>-4</sup> mole) du composé de l'étape c) de l'exemple 2 sont dissous dans 3.5 ml de DiméthylSulfoxyde (DMSO) à 70°C. Le milieu réactionnel est ramené à température ambiante. 0.135g de 3,4-Diéthoxy-3-cyclobutène-1,2-dione sont mélangés

à 0.4 ml d'éthanol et la solution obtenue est introduite en une seule fois dans le milieu réactionnel. 34 µl de triéthylamine sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité 5 heures à température ambiante. Le mélange est précipité dans 200 ml d'éthanol et l'agitation est maintenue une nuit à température ambiante. Le précipité est filtré et 5 séché sous vide. 1.29 g de produit sont isolés.

HPLC :Colonne Superspher RP-SELECT B ;eau - TFA pH 3 / CH<sub>3</sub>CN;Tr:7.60 min

Spectre de masse :Mode ES<sup>+</sup> m/z = 2199.8 avec z = 4

#### EXEMPLE 4

10 Composé de formule VII<sub>1</sub> dans laquelle x = 2

a)

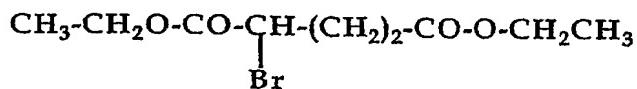
A une suspension de 70 g de 3,6,9-15-tétraazabicyclo[9.3.1.]pentadéca-1(15),11,13-triène dans 800 ml de CH<sub>3</sub>CN en présence de 910 ml de résine échangeuse d'anions sous forme de base forte (Amberlite® IRA458), on ajoute une solution de 102 g de 15 l'ester 2-bromo-4-nitrophénol butyrate de méthyle dans 100 ml de CH<sub>3</sub>CN. Après agitation 3 jours à 25° C, filtration de la résine et évaporation, l'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de 5 kg de silice (Merck®, 40-60 µm) en éluant avec un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH (70/30 v/v). On obtient 38 g de produit.

HPLC : Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 3 / CH<sub>3</sub>CN;tr : 15 min

20 RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO<sub>d</sub>6, 30° C):

δ (ppm) : 160,1 (C<sub>1</sub>) ; 53,8 (C<sub>2,4</sub>) ; 45-45,4-45,7 (C<sub>5,7,8</sub>) ; 51,3 (C<sub>10</sub>) ; 161,6 (C<sub>11</sub>) ; 119,3 (C<sub>12</sub>) ; 119,6 (C<sub>14</sub>) ; 137,6 (C<sub>13</sub>) ; 51,7 (O-CH<sub>3</sub>) ; 172,8 (C=O) ; 65,8 (C-N) ; 31,06-31,45 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 149,6-129,6-122 (Ar) ; 145,6 (Ar-NO<sub>2</sub>).

25 b) Réaction avec Y"Br =



A une solution de 7 g du composé obtenu à l'étape a) dans 70 ml de CH<sub>3</sub>CN et 35 ml d'éther diisopropylique, on ajoute 6,8 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 13 g de 2-bromoglutarate d'éthyle puis on laisse sous agitation 24 h à reflux. Après élimination des sels par filtration, 30 concentration de la solution, l'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur silice (Merck® 40-63 µm) en éluant avec un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone (70/30 v/v). On obtient 6 g de produit solide

HPLC : Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 2.8 / CH<sub>3</sub>CN;tr : 33 min

## c) Hydrolyse des groupes esters éthyliques

- 6 g du composé obtenu à l'étape b) sont ajoutés à une solution de 10 ml d'HCl 12N, puis le mélange est agité 48 h à sa température de reflux. Après filtration, 5 concentration, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice silanisée (Merck® 0,063-0,20 µm) en éluant avec un mélange H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH pour donner 2,8 g de produit.

HPLC : Colonne Symmetry® C18; eau-TFA pH 2.8 / CH<sub>3</sub>CN; tr : 17-19 min

## 10 d) Chélate de gadolinium du composé précédent

- Dans 35 ml d'une solution à pH 5 de 3,9 g du composé obtenu selon l'étape c), on introduit 2 g de GdCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O et on maintient le mélange à 50° C pendant 5 h au cours desquelles on ajuste le pH si nécessaire en ajoutant une solution de NaOH aqueux (2N). Le milieu est ensuite filtré puis évaporé ; 4 g de résine échangeuse de cations faiblement acide Chelex® 100 (Bio-Rad) sont ajoutés à l'huile obtenue dissoute dans 40 ml d'eau. Après agitation 2 h à 25° C, la résine est éliminée par filtration, la solution est évaporée pour donner 4,5 g de produit.

HPLC : Colonne Symmetry® C18; eau-TFA pH 2.8 / CH<sub>3</sub>CN; tr : 15.6-18.7 min

## 20 e) Réduction du groupe nitro

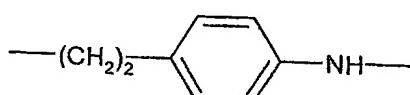
En appliquant le même mode opératoire que pour l'étape e) de l'exemple 1, on obtient 4 g de produit à partir de 4,5 g du composé obtenu à l'étape d).

HPLC : Colonne Symmetry® C18; eau-TFA pH 2.8 / CH<sub>3</sub>CN; tr : 8.6-9.5 min

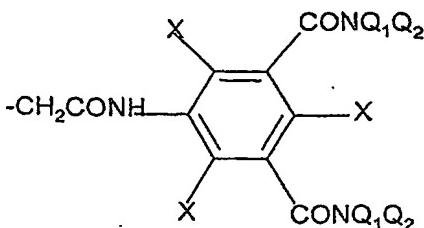
25 EXEMPLE 5

Composé de formule : II''<sub>a2</sub> avec x=2

-GNH- est

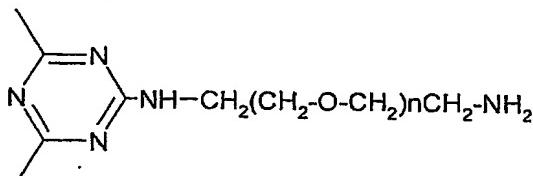


R est



avec  $Q_1 = Q_2 = \text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$  et  $X = \text{Br}$

D' est



avec  $n=2$

a) condensation sur le cycle triazine

5 g du composé obtenu à l'étape e) de l'exemple 4, sont condensés sur le 2,4,6-

10 trichloro-1,3,5-triazine selon le protocole décrit à l'étape a) de l'exemple 2. Après 3 h de réaction, le pH est ramené à 7 par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium. La solution obtenue est conservée une nuit au réfrigérateur.

Spectre de masse :Mode ES<sup>-</sup> m/z = 852.7 avec z = 2;

HPLC :Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 2.95 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 20-25 min.

15

b) couplage de l'amine R-NH<sub>2</sub>

A la solution eau-dioxane contenant 4.2 g du composé obtenu à l'étape a), sont ajoutés 14 g de l'amine de formule RNH<sub>2</sub>, 2.68 g de chlorhydrate de 1-(3-dimethyl-

20 aminopropyl)-3-ethyl-carbodiimide (EDCI), et 0.326 g de sel de sodium de l'acide (N-hydroxysuccinimidyl)-3-sulfonique (NHS). Le couplage est réalisé selon le protocole décrit à l'étape b) de l'exemple 2 pour obtenir 18 g de produit.

Spectre de masse :Mode ES<sup>-</sup> m/z = 1024.9 avec z = 6

HPLC :Colonne Symmetry® C18 ;eau-TFA pH 2.7 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 13 min.

25

c) introduction de la diamine

Dans une solution de 70 ml de dimethylsulfoxyde, contenant 18 g du composé obtenu à l'étape b), sont introduits 20 ml de 2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethylamine. Le mélange

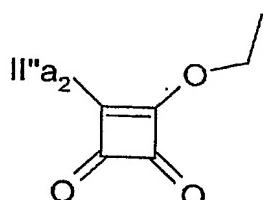
est agité durant 1 heure à 50°C. Après refroidissement à 25 °C, la solution est versée sur 1000 ml d'éthanol, le précipité formé est dissous dans 400 ml d'eau et la solution ultra filtrée sur une membrane de seuil de coupure 1 KD. Après évaporation du rétentat, le produit obtenu est purifié par HPLC préparative. 1.5 g de solide sont ainsi obtenus.

5 Spectre de masse :Mode ES<sup>-</sup> m/z = 2087.2 avec z = 3

HPLC :Colonne Symmetry® C18 ;eau-TFA pH 2.7 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 11 min.

### EXEMPLE 6

Composé de formule :



10

Avec : x, -GNH-, R, Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub>, X, D' et n tels que définis exemple 5 et D-H= D'

0,5 g du composé obtenu à l'exemple 5c sont dissous dans 2 mL de DMSO à 80°C, le milieu réactionnel est placé à température ambiante puis 17 µL de triéthylamine et 59 µL de 3,4-Diéthoxy-3-cyclobutène-1,2-dione sont ajoutés et le milieu réactionnel agité 5 h à température ambiante. Le milieu réactionnel est précipité dans 20 mL d'éthanol. Le précipité est filtré, lavé à l'éthanol puis séché sous vide. 500 mg de produit sont obtenus.

15 Spectre de masse :

20 Mode ES<sup>-</sup> m/z = 6390.5 avec z = 1

HPLC :Colonne Colonne Superphere RP Select B ® ;eau-TFA pH 2.8 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 15.9 min.

### EXEMPLE 7

25 Composé de formule VI avec x = 2 selon méthode du tableau 2

a) Composé de formule VI(1) avec B = éthyle

22 g de 13-bromo-3,6,9,15-tétraazabicyclo[9.3.1.]pentadéca-1(15),11,13-trène sont introduits dans 440 ml de CH<sub>3</sub>CN en présence de 48 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> calciné et le mélange 30 est maintenu à 80° C pendant 1 h avant l'addition d'une solution de 93 g de 2-bromoglutarate d'éthyle dans 100 ml de CH<sub>3</sub>CN ; le milieu réactionnel est alors agité 20

h à 80° C puis refroidi à température ambiante, filtré et le solvant est évaporé. Le résidu est repris par 500 ml d'une solution aqueuse de HCl 1N en présence d'un volume d'éther diéthylique. Après séparation de la phase organique, la phase aqueuse est neutralisée par NaHCO<sub>3</sub> puis extraite par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Après lavage à l'eau puis séchage sur sulfate de magnésium, la phase organique est concentrée et le résidu est purifié sur colonne de silice (Merck® 500 g, d = 10 cm) en éluant par CH<sub>3</sub>COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

m = 37 g ;

HPLC :Colonne Symmetry® C18 ;eau-TFA pH 3 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 26 min.

10 b) Composé de formule VI (2)

On ajoute 23,5 g de 3-(tert-butyloxycarbonylamino)-propène, 25,3 ml de triéthylamine, puis 3,4 g de triphénylphosphine et enfin 1,8 g d'acétate de palladium à une solution de 28 g du composé obtenu à l'étape a) dissous dans 400 ml de toluène. Après chauffage à 80° C pendant une nuit sous atmosphère inerte, le milieu est évaporé et le résidu est repris par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (pH = 1). La phase aqueuse est lavée avec 1 volume d'éther diéthylique puis de toluène avant d'être amenée à pH 6 par addition de NaOH (1N). Après extraction de la solution aqueuse par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la phase organique séchée sur sulfate de magnésium est évaporée. On obtient une huile marron.

m = 17 g,

20 HPLC :Colonne Symmetry® C18 ;eau-TFA pH 3 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 14-19 min.

c) Composé de formule VI (3)

A 17 g du composé obtenu à l'étape b) dissous dans 350 ml de CH<sub>3</sub>OH, on ajoute 3 g de catalyseur charbon palladié à 10% puis le milieu réactionnel est agité durant 2 h 30 à 25 20° C sous 4.10<sup>5</sup> Pa d'hydrogène. Après filtration sur Clarcel®, le solvant est évaporé et on obtient 16,8 g d'huile brute

HPLC :Colonne Symmetry® C18 ;eau-TFA pH 3 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 15-16-21 min.

d) Hydrolyse des groupes esters éthyliques

30 20 g du composé obtenu à l'étape c) dissous dans 50 ml d'une solution aqueuse de NaOH 5N et 80 ml de CH<sub>3</sub>OH sont chauffés à 70° C pendant 18 h. Après concentration du milieu réactionnel, le résidu est repris dans l'eau et la solution, amenée à pH 5,5-6 par quelques gouttes d'acide acétique, est concentrée avant d'être purifiée par chromatographie sur une colonne (d = 15 cm) contenant 1 kg de silice silanisée

(Merck® 0,063 – 0,200 µm) en éluant à l'eau. Après concentration à sec on obtient 9,3 g de cristaux blancs.

HPLC :Colonne Symmetry® C18 ;H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans l'eau (0,037 N)/CH<sub>3</sub>CN;tr = 16,7 – 17,5 – 17,9 min

5

e) Complexation du gadolinium

8,7 g du composé obtenu à l'étape d) sont dissous dans 70 ml d'eau puis on ajoute en une fois 2,1 g de Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et l'ensemble est chauffé à 60° C durant 3 h 45 min en maintenant le pH entre 5,5 et 6 par addition d'une solution aqueuse de NaOH 1N. Après filtration, le milieu réactionnel est évaporé et le résidu est cristallisé dans l'éthanol. On obtient 9,6 g de cristaux blancs.

HPLC :Colonne Symmetry® C18 ;H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans l'eau (0,037 N)/CH<sub>3</sub>CN;tr = 31-31,7-32,2-33 min

10

f) Libération de l'amine

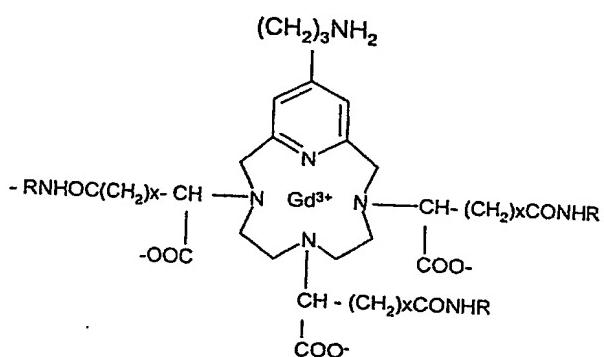
On maintient 3 h sous agitation une solution de 9 g du complexe obtenu à l'étape e) dans 180 ml de CF<sub>3</sub>COOH à 25° C avant d'éliminer le liquide sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'éther diéthylique et la suspension filtrée. Après élimination du solvant, le résidu est introduit par portions dans une suspension d'au moins 5 ml de résine anionique faible (OH<sup>-</sup>) dans 50 ml d'eau ; en fin d'addition le pH, stable, doit être de 8 à 8,5. La résine est alors séparée par filtration, le solvant éliminé et le résidu précipité par addition d'éther éthylique.

20

EXEMPLE 8

25

préparation du chélate intermédiaire de formule VIII

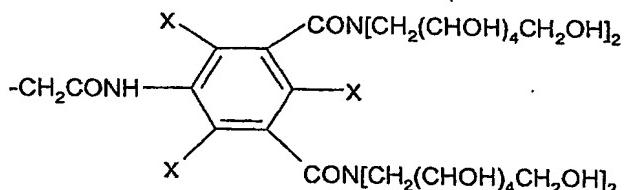


et R représente

X = Br

5 a) couplage de l'amine R-NH<sub>2</sub>

6g de composé obtenu à l'étape e) de l'exemple 7 et 26,5g de l'amine RNH<sub>2</sub> sont dissous dans 200 ml d'eau et on ajoute 7,6g d'EDCI et 0,4g de NHS. Le mélange est maintenu sous agitation vers pH6, pendant 24 heures, avec addition d'une solution



aqueuse de NaOH ou HCl N si nécessaire. Après évaporation du solvant, on fait 10 cristalliser le résidu par addition d'éthanol. Les 35g de cristaux jaunes obtenus sont dissous dans 200 ml d'eau et la solution ultrafiltrée avec une membrane en polyéthersulfone (Pall®) de 1kD de seuil de coupure.

Le rétentat est concentré et purifié par chromatographie sur colonne de silice silanisée (Merck ®) (diamètre : 7 cm, hauteur : 33 cm) en éluant avec de l'eau puis des mélanges 15 eau/méthanol (90/10 V/V à 80/20). Les fractions contenant le produit cherché sont concentrées jusqu'à élimination des solvants. Le résidu, dissous dans 50 ml d'eau, est traité par 20 ml de résine anionique sous forme OH<sup>-</sup> (HP 661 de chez Rohm et Haas) puis traité avec du noir de carbone à 45°C. Après filtration et élimination des solvants, on isole 10g de cristaux blancs.

20 HPLC : Colonne Symmetry® C18 ; H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN; tr = 15 min

CES : conditions n° 1 tr = 40 min

b) Déprotection de l'amine

Le solide obtenu ci-dessus est dissous dans 200 ml d'acide trifluoroacétique. Après 25 3 heures d'agitation à température ambiante, le liquide est éliminé sous pression réduite et le résidu cristallisé par addition d'éther diéthylique. On obtient ainsi 8,8g de cristaux blancs, trifluoroacétate de l'amine de formule VIII.

HPLC : Colonne Symmetry® C18 ; H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN; tr = 4-5.3-5.9 min

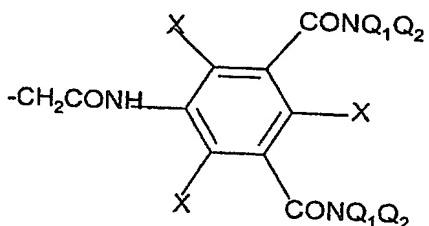
EXEMPLE 9

Composé de formule :  $\text{II}''_2$  avec  $x=2$

-GNH- est

5     $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

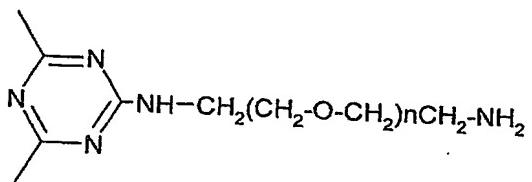
R est



avec  $Q_1 = Q_2 = \text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$  et  $X = \text{Br}$

10

D' est



avec  $n=2$

15    a) condensation sur le cycle triazine

A une solution contenant 4 g du composé obtenu selon l'étape b) de l'exemple 8 dans 25 ml d'eau distillée est rajouté 0,132 g de carbonate de potassium. On rajoute une solution de 0,080 g de 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine dans 5,5 ml de dioxane puis le pH est amené à 8,4 par ajout de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Après neutralisation par résine cationique sous forme  $\text{H}^+$ , les solvants sont évaporés et le résidu est repris dans l'éthanol absolu. Le précipité est isolé.

3.7 g de produit sont isolés.

Spectre de masse :Mode ES+  $m/z = 2099$  avec  $z = 4$

HPLC :Colonne Symmetry® C18; eau /  $\text{CH}_3\text{CN}$ ;  $\text{tr} = 10.8$  min.

25

b) introduction de la diamine

Au départ d'une solution contenant 3,7 g du composé obtenu à l'étape a) dans 30 ml de diméthylsulfoxyde, de 0,220 g de carbonate de potassium et 1,3 g de diamine 2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethylamine selon le protocole décrit à l'étape 5c), et après 5 purification par HPLC préparative, 1 g de produit est obtenu.

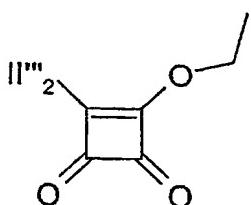
Spectre de masse :

Mode ES<sup>-</sup> m/z = 1700.3 avec z = 5

HPLC :Colonne Lichrospher C18®;eau-TFA pH 3.3 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 13.8 min.

10 EXEMPLE 10

Composé de formule :



Avec : x, -GNH-, R, Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub>, X, D' et n tels que définis exemple 9 et D-H=D'

15 0,8 g du composé obtenu à l'étape b) de l'exemple 9 et 73 µl de 3,4-Diéthoxy-3-cyclobutène-1,2-dione sont dissous dans 3 ml de diméthylsulfoxyde. Après rajout de 20 µl de triéthylamine, la milieu est laissée 4H à température ambiante. Le produit obtenu par précipitation dans 20 ml d'éthanol est essoré puis lavé 2 fois avec 10 ml d'éthanol et d'éther. Obtention de 650 mg de cristaux blancs.

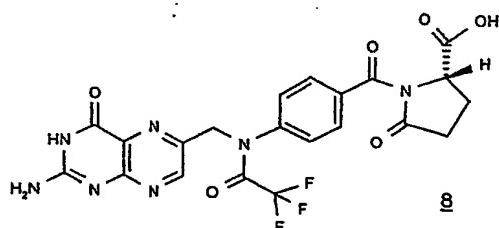
20 HPLC :Colonne Colonne Superpher RP Select B ® ;eau-TFA pH 2.8 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 12 min.

EXEMPLE 11

J.Am. Chem.Soc, 1997, 119, 10004-10013

25

a) composé de formule :

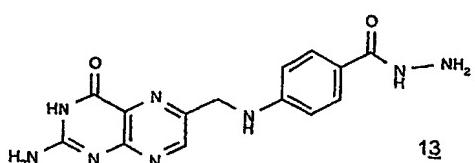


Dans un tricol de 1 litre équipé d'un réfrigérant, d'une agitation magnétique, d'un thermomètre et d'une ampoule à brome, 50 g (0.113 mole) d'acide folique sont mis en suspension dans 500 ml de THF puis l'ensemble est refroidi à 0°C. Ajout goutte à goutte de l'anhydride trifluoroacétique acide (128 ml, 0.906 mole, 8 eq) en veillant à ce

- que la température ne dépasse pas 5°C. Agitation à 5°C pendant 6 H. Le tricol est enveloppé de papier aluminium et laissé une nuit au réfrigérateur. Evaporation au rotavapor à 40°C jusqu'à l'obtention d'une huile. Précipitation dans 3 litres d'éther et agitation 2 H à T° ambiante. Filtration sur fritté et séchage sous vide à 30°C pendant une nuit. masse obtenue: 54.4 g

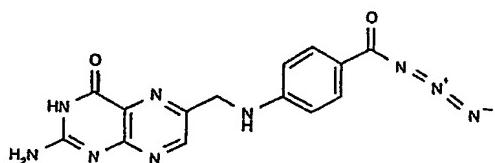
HPLC:Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 3/ CH<sub>3</sub>CN ;tr = 33 min.

b) composé de formule:



- Dans un ballon de 1 litre équipé d'une agitation magnétique, 54.4 g (0.088 mole) du produit obtenu précédemment sont ajoutés par petites fractions dans 540 cc (11 moles, 125 eq) d'hydrate d'hydrazine. Le milieu réactionnel est agité 24 H à température ambiante. Précipitation dans 4 litres de méthanol et agitation 4 H à température ambiante. Filtration sur fritté, clairçage du précipité au méthanol puis à l'ether. Séchage à 40°C dans l'étuve ventilée pendant une nuit. masse obtenue: 30 g
- HPLC:Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 3/ CH<sub>3</sub>CN ;tr= 10.50 min.

c) composé de formule:



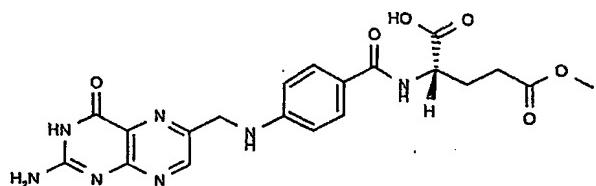
25

Dans un tricol de 250 cc équipé d'un réfrigérant, d'une agitation magnétique, d'un thermomètre et d'une ampoule à brome, 10 g (0.0306 mole) de produit obtenu précédemment et 0.15 g (1.53.10<sup>-3</sup> mole, 0.05 eq) de KSCN sont introduits. Sans agiter, refroidir le milieu réactionnel à -10°C. Introduire 134 ml d'acide trifluoroacétique

et agiter à -10°C jusqu'à complète dissolution. Ajout goutte à goutte du n-butylnitrite ( 3.15 g, 0.0306 mole, 1 eq ) en veillant à ce que la température ne dépasse pas -5°C. Agitation à -10°C pendant 6 H. Laisser revenir à Température ambiante et ajouter 1 g de NaN<sub>3</sub> ( 0.015 mole, 0.5 eq ). Agitation à Température ambiante pendant une nuit. Le 5 milieu réactionnel est introduit dans une ampoule à brome et versé goutte à goutte dans 350 ml d'isopropanol préalablement refroidi à 0°C. Agitation 2 H en veillant à ce que la Température ne dépasse pas 10°C. Filtration du précipité sur fritté. Lavage du précipité par 400 ml de CH<sub>3</sub>CN et agitation une nuit à Température ambiante. Filtration sur fritté. Lavage du précipité par 200 ml d'eau pendant 1 H à Température ambiante. Filtration 10 sur fritté et clairçage à l'éther. Séchage sous vide à Température ambiante pendant une nuit. masse obtenue : 13.5 g

HPLC :Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 3/ CH<sub>3</sub>CN ;tr = 35.40 min.

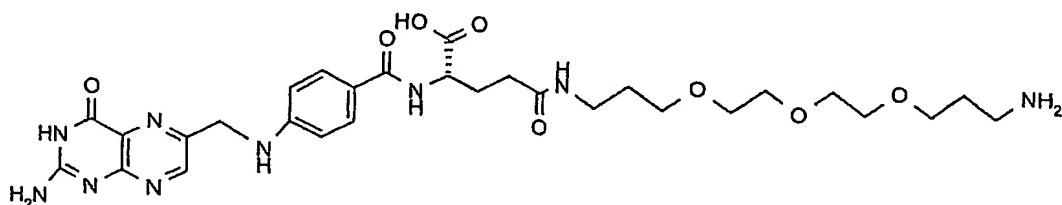
d) composé de formule:



Dans un tricol de 100 ml équipé d'une agitation magnétique et d'une ampoule à brome, 5.18 g ( 0.0153 mole ) de composé préparé à l'étape précédente et 2.72 g ( 0.0168 mole, 1.1 eq ) de L.glutamic acid 5 methyl ester sont mis en suspension dans 60 ml de 20 DMSO. Le milieu réactionnel est refroidi à 5°C et la 1,1,3,3, Tetramethylguanidine ( 3.84 ml, 0.0306 mole, 2 eq ) est introduite lentement en veillant à ce que la Température ne dépasse pas 15°C. Agitation pendant environ 15 minutes à 10°C jusqu'à l'obtention 25 d'un milieu homogène puis agitation 4 H à Température ambiante. Filtration d'un léger insoluble. Précipitation dans 800 ml d'acétone et agitation une nuit à Température ambiante. Filtration sur fritté et claircage à l'éther. Séchage sous vide à Température ambiante. Masse obtenue: 6.4 g

HPLC :Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 3/ CH<sub>3</sub>CN ;tr = 22.60 min.

e) composé de formule:

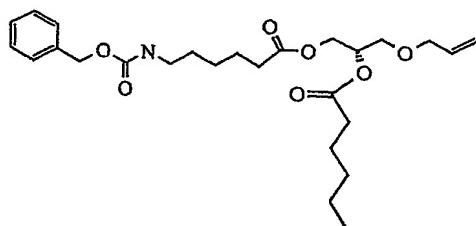


Dans un monocol de 500 ml équipé d'une agitation magnétique, 9.74 g ( 0.0214 mole )  
 5 de produit précédemment préparé sont solubilisés dans 60 ml de DMSO à Température  
 ambiante. Ajout de 235 ml ( 1.07 mole, 50 eq ) de 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecanediamine  
 en une seule fois et agitation 48 H à Température ambiante. Filtration d'un léger  
 insoluble. Précipitation du filtrat dans un mélange constitué de 1500 ml de CH<sub>3</sub>CN et de  
 10 1500 ml d'éther. Agitation 3 H à Température ambiante. Filtration sur fritté. Séchage  
 sous vide à Température ambiante. Masse obtenue : 9.5 g

HPLC:Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 3/ CH<sub>3</sub>CN ;tr = 16 min.

### EXEMPLE 12

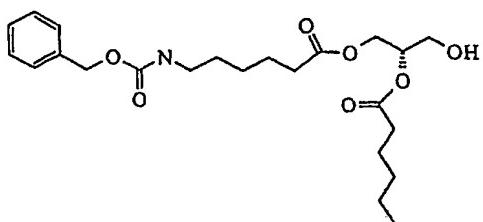
15 a) condensation des 2 chaînes grasses



Une solution de 0.61 g de DMAP ( diméthylaminopyridine ) et 41.5 g de DCC  
 (dicyclohexylcarbodiimide) dans 50 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est additionnée, goutte à goutte à  
 0°C , à une solution de 28 g de 3-allyloxy-1,2(R)-propanediol et de 12.5 g d' acide N-  
 20 CBZ-6-amino hexanoïque dans 500 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Après agitation 1h à 0°C puis 1h à  
 TA , ce mélange est filtré sur verre fritté puis concentré et remis en solution dans 500 ml  
 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en présence de 25 ml d'acide hexanoïque .A ce mélange est ajouté , goutte  
 à goutte et à TA , une solution de 41g de DCC et 1.22g de DMAP dans 50 ml de  
 25 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le milieu est agité 1h à TA, puis à nouveau filtré et évaporé. On obtient 25g  
 d'huile jaune.

HPLC:Colonne Symmetry® C18 (4.6x100);eau-TFA pH 3,2/ CH<sub>3</sub>CN ;tr = 16,5 min.

## b) déprotection de l'allyle



On ajoute 0.5g de  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  et 2.33g de triphénylphosphine à une solution de 25g de 5 composé obtenu à l'étape a) dissous dans 300ml d'acide acétique. Après chauffage à 80°C pendant 5 jours, le milieu est filtré sur fibre de verre puis évaporé. Le résidu est purifié par HPLC préparative.

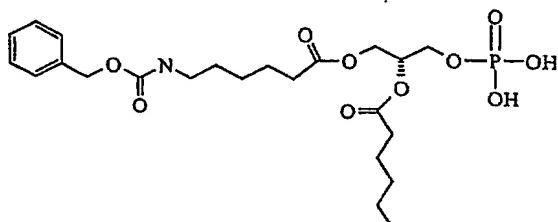
HPLC: Colonne Symmetry® C18 (4.6x100); eau-TFA pH 3,2/  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; tr = 14, 14.5, 17.7 min.

10 RMN:

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.45 (5 H aromatiques), 5.25 ( $\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$ ), 4.65 – 4.20 et 3.90 (2  $\text{CH}_2\text{O}$ - et  $\text{CHO}$  du glycérol), 3.37 ( $\text{OCO-NH-CH}_2-$ ), 2.53 (m, 2  $\text{OCO-CH}_2-$ )

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ): 173.9 (2  $\text{OCO-CH}_2$ ), 156.9 ( $\text{OCO-NH}$ ), 137 ( $\text{C}^{\text{IV}}$  aromatique), 128.9 / 128.5 (5  $\text{CH}$  aromatique), 68.5 ( $\text{CH}$  du glycérol), 67.0 / 65.4 (2  $\text{CH}_2$  du 15 glycérol), 41.2 ( $\text{OCO-NH-CH}_2-$ )

## c) phosphorylation

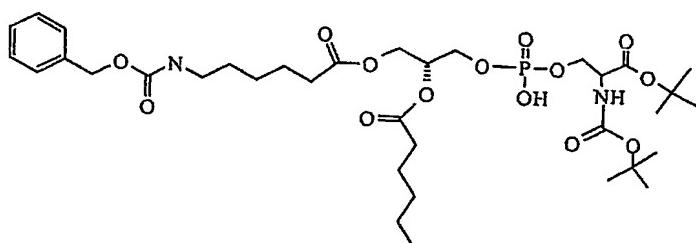


On ajoute goutte à goutte et à 0°C une solution de 6g du composé obtenu à l'étape b) 20 dissous dans 46 ml de toluène à une solution de 1.92 ml de  $\text{POCl}_3$  et 2.85 ml de triethylamine dissous dans 18 ml d'heptane. Après agitation 1h à 0°C puis 1 nuit à Température ambiante, le milieu est hydrolysé avec 30 ml d'eau, 2h à Température ambiante puis décanté. La phase organique est concentrée puis purifiée par un lavage acido-basique. On obtient une huile jaune m=5.4g

25 HPLC: Colonne X-TERRA® MS C18; ( $\text{NH}_4)_2\text{CO}_3\text{-H}_2\text{O}$  pH 9/  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; tr = 13.3-14 min.

RMN : $^{31}\text{P}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : -3.5 ppm

## d) couplage de la sérine



5

A une solution de 5.3g de composé obtenu à l'étape c) et 5.35g de N-(ter-Butoxycarbonyl)-L-serine t-Butylester (Boc-L-Ser-OtBu) dans 80 ml de pyridine est additionnée goutte à goutte et à Température ambiante une solution de composée de 9.3g de chlorure de triisopropylbenzènesulfonyle dissous dans 60 ml de pyridine. Ce mélange est agité 18h à Température ambiante puis hydrolysé avec 120 ml d'eau. Après concentration , le résidu est purifié par HPLC préparative

HPLC :Colonne Lichrospher C18®;eau-TFA pH 3.3 /  $\text{CH}_3\text{CN}$  ; $r = 11.7$  min.

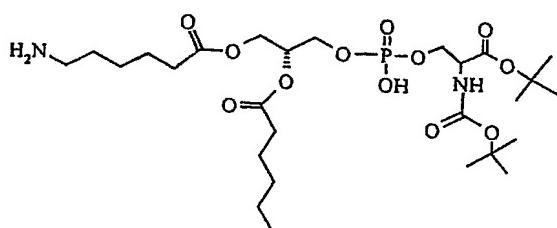
RMN :

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 4.50 – 4.10 ( $\text{CH}_2\text{O}-\text{P}$  du glycérol,  $\text{CH}_2\text{O}-\text{P}$  de la sérine,  $\text{CH}-\text{NH}$  de la sérine), 1.40 (6  $\text{CH}_3$  des tBu)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 82.9 / 80.5 (2  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 64.9 ( $\text{CH}_2\text{O}-\text{P}$  du glycérol), 64.3 ( $\text{CH}_2\text{O}-\text{P}$  de la sérine), 56.7 ( $\text{CH}-\text{NH}$  de la sérine), 28.7 / 28.4 (6  $\text{CH}_3$  des tBu)

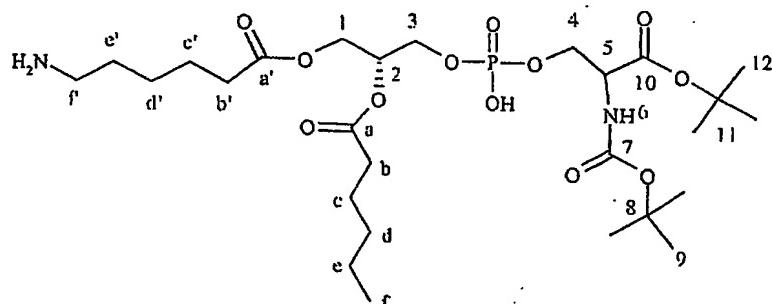
$^{31}\text{P}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : -2.5 ppm

## 20 e) déprotection du CBZ



A 3.8g de composé obtenu à l'étape d) dissous dans 200ml de 2-methyl-2-propanol on ajoute 0.5g de catalyseur charbon palladié à 10% , puis le milieu réactionnel est agité durant 6h à 30°C sous  $20.10^5$  Pa d'hydrogène. Après filtration sur fibre de verre , le solvant est évaporé et le résidu est purifié par HPLC préparative

HPLC :Colonne Symmetry® C18 (4.6x100);eau-TFA pH 3,2/  $\text{CH}_3\text{CN}$  ; $r = 7.6$  min.

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>):

6.26 – 6.10 (1 ddd, H<sub>6</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H5-H6</sub> = 7.9 Hz), 4.60 / 3.99 (2 m, H<sub>1</sub>), 4.54 (1 m, H<sub>2</sub>), 4.26 / 4.16 (2 m, H<sub>3</sub>), 4.25 (1 m, H<sub>5</sub>), 4.15 / 4.11 (2 m, H<sub>4</sub>), 2.91 (1 m, H<sub>f</sub>), 2.41 (1 m, H<sub>b'</sub>), 2.30 (1 m, H<sub>b</sub>), 1.60 (1 m, H<sub>c</sub>), 1.72 (1 m, H<sub>c'</sub>), 1.69 (1 m, H<sub>e</sub>), 1.47 (1 m, H<sub>d'</sub>), 1.44 (1 m, H<sub>g</sub>), 1.41 (1 m, H<sub>12</sub>), 1.29 (1 m, H<sub>e</sub>), 1.28 (1 m, H<sub>d</sub>), 0.86 (1 t, H<sub>f</sub>)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>):

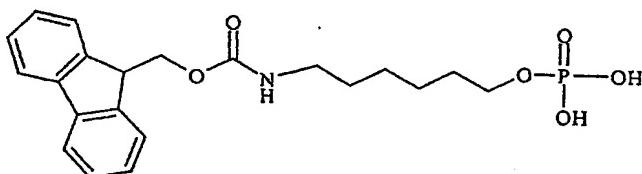
173.6 (C<sub>a'</sub>), 173.3 (C<sub>a</sub>), 169.5 (C<sub>10</sub>), 155.8 (C<sub>7</sub>), 82.1 (C<sub>11</sub>), 79.5 (C<sub>8</sub>), 71.5 (C<sub>2</sub>), 65.8 (C<sub>4</sub>), 63.9 (C<sub>1</sub>), 63.2 (C<sub>3</sub>), 55.2 (C<sub>5</sub>), 39.5 (C<sub>f</sub>), 33.8 (C<sub>b</sub>), 33.7 (C<sub>b'</sub>), 28.4 (C<sub>12</sub>), 28.0 (C<sub>9</sub>), 26.7 (C<sub>e'</sub>), 25.3 (C<sub>d</sub>), 24.4 (C<sub>c</sub>), 24.0 (C<sub>c'</sub>), 22.1 (C<sub>e</sub>), 13.6 (C<sub>f</sub>)

<sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>):

0.85 / 0.75 ppm.

EXAMPLE 13

## a) phosphorylation

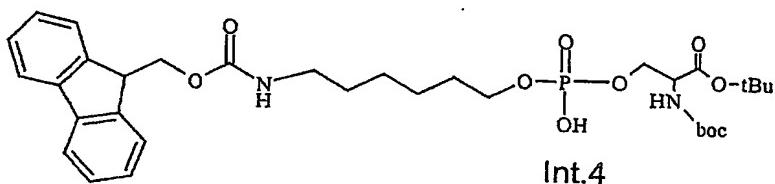


1.23ml de POCl<sub>3</sub> et 1.63ml de triéthylamine sont mis en solution dans 9ml d'heptane à 0°C. L'alcool (N(Fmoc)-amino-6-hexanol, 3g) est dissous dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et additionné goutte à goutte à la solution précédente sans dépasser 0°C. Le milieu réactionnel est ensuite agité 1h à 0°C puis 18h à Température ambiante. 30 ml d'eau sont ajoutés et le milieu est agité 2h à Température ambiante. Les deux phases sont séparées ; la phase

organique est concentrée. Le solide résultant est lavé à l'eau, filtré et séché sous vide. 3g de produit sont obtenus.

HPLC :Colonne X-TERRA® MS C18;(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O pH 9/ CH<sub>3</sub>CN ;tr = 14.1 min.

5 b) couplage de la sérine

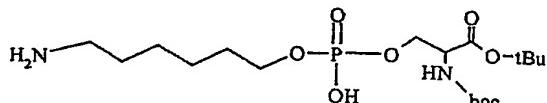


10 3g du composé précédemment obtenu et 3.73g de Boc-Ser-OtBu sont dissous à Température ambiante dans 54 ml de pyridine. Une solution de 6.49g de TIS ( triisopropylbenzenesulfochloride ) dans 42 ml de pyridine est additionnée goutte à goutte et le milieu est agité à Température ambiante, 48h. Puis le milieu réactionnel est hydrolysé avec 30 ml d'eau, agité 4h à Température ambiante et concentré ensuite à sec. Le brut obtenu est repris dans 100 ml d'Et<sub>2</sub>O, le précipité formé est filtré sur verre fritté. Le filtrat est concentré puis purifié par chromatographie sur silice, élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

15 95% - MeOH 5%. 3.9 g de produit sont obtenus.

HPLC :Colonne X-TERRA® MS C18;(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O pH 9/ CH<sub>3</sub>CN ;tr = 20 min.

c) clivage du Fmoc

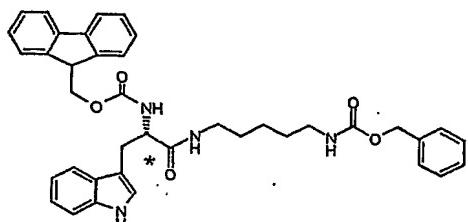


20 25 3g de composé obtenu à l'étape précédente et 0.62ml de pipéridine dans l'acétonitrile sont agités 12h à Température ambiante .Il se forme un précipité blanc. Le milieu réactionnel est filtré, les cristaux sont lavés avec 2 fois 50 ml de CH<sub>3</sub>CN puis recristallisés dans 100 ml de CH<sub>3</sub>CN. 0.9 g de produit sont obtenus.

HPLC :Colonne Symmetry® C18;eau/ MeOH;tr = 13.6 min.

EXEMPLE 14

a) Benzyl5-[(2S)-2-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}-3-(1H-indol-3-yl)propanoyl]amino}pentylcarbamate



5

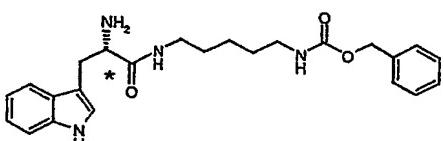
15.63 g de ((2R)-2-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}-3-(1H-indol-3-yl)propanoic acid) sont solubilisés à température ambiante dans 300 ml de tétrahydrofurane. 10 g de (Benzyl 5-aminopentylcarbamate) puis 5.1 ml de triéthylamine sont additionnés. L'ensemble est agité 5 minutes à température ambiante. 5.94 g d'Hydroxy-1-benzotriazole hydraté puis 8.43 g de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide chlorhydrate sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel et l'ensemble est agité 24 heures à température ambiante. L'insoluble est éliminé par filtration. Le filtrat est concentré sous vide. L'huile obtenue est versée dans 150 ml d'eau et l'ensemble est fortement agité pendant 1 heure à température ambiante. Le précipité obtenu est lavé sous forte agitation dans 100 ml d'eau, filtré puis lavé par 200 ml d'éther éthylique. Le précipité est filtré et séché. 22.78 g sont isolés.

CCM : $\text{SiO}_2$  Merck®;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ -80/20;  $rf = 0.94$  min.

HPLC :Colonne Symmetry® C18; eau-TFA pH 2.95/  $\text{CH}_3\text{CN}$ ;  $tr = 40$  min.

20 Spectre de masse :Mode ES+  $m/z = 645$  avec  $z = 1$

b) Benzyl 5-[(2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propanoyl]amino}pentylcarbamate



25 20 g du composé obtenu précédemment sont solubilisés à température ambiante dans 280 ml de tétrahydrofurane. 41.4 ml de pipéridine et 20 ml d'eau sont ensuite additionnés. L'ensemble est agité 3 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est concentré sous vide. L'huile obtenue est purifiée sur silice. Elution

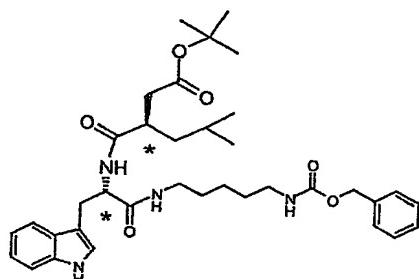
[CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / CH<sub>3</sub>OH] (9.5/0.5). Après évaporation et séchage sous vide, 12.77 g de produit sont isolés.

CCM : SiO<sub>2</sub> Merck®; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH-95/5; rf = 0.64 min.

HPLC : Colonne Symmetry® C18; eau-TFA pH 2.95 / CH<sub>3</sub>CN ; tr = 19.5 min.

Spectre de masse : Mode ES+ m/z = 423 avec z = 1

c) tert-butyl (12S)-12-(1H-indol-3-ylmethyl)-(15R)-15-isobutyl-3, 11, 14-trioxo-1-phenyl-2-oxa-4, 10, 13-trazaheptadecan-17-oate



10

9.16 g de (2 (R )-(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-4-methylpentanoic acid ) synthétisé selon le mode opératoire décrit dans (J. Med. Chem. 1998, Vol 41, N°2 p 209), sont solubilisés à température ambiante dans 160 ml de tétrahydrofurane. Une solution homogène formée par 16.81 g du composé préparé à l'étape précédente dans 165 ml de

15 tétrahydrofurane est additionnée en une seule fois suivi par, successivement, 8.3 ml de triéthylamine, 6.45 g d'Hydroxy-1-benzofiazole hydraté et 9.15 g de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide chlorhydrate. L'ensemble est agité 12 heures à température ambiante. L'insoluble est éliminé par filtration. Le filtrat est concentré sous vide. L'huile obtenue est purifiée sur silice Elution du bon produit par [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /

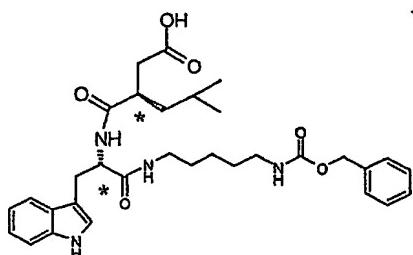
20 CH<sub>3</sub>OH] (98/2). Après évaporation, et séchage sous vide 24 g de produit sont isolés.

CCM : SiO<sub>2</sub> Merck®; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH-95/5; rf = 0.42 min.

HPLC : Colonne Symmetry® C18; eau-TFA pH 2.95 / CH<sub>3</sub>CN ; tr = 25.7 min.

Spectre de masse : Mode ES+ m/z = 635 avec z = 1

25 d) (12S)-12-(1H-indol-3-ylmethyl)-15-isobutyl-3, 11, 14-trioxo-1-phenyl-2-oxa-4, 10, 13-trazaheptadecan-17-oic acid



1.4 g de dithioerythritol sont additionnés dans un mélange composée de 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et de 100 ml d'acide trifluoroacétique. Le mélange est agité, sous argon, jusqu'à totale dissolution. 10 g du composé préparé précédemment sont ensuite ajoutés. L'ensemble est agité 30 minutes à température ambiante puis concentré sous vide. L'huile obtenue est purifiée sur silice [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / CH<sub>3</sub>OH] (98/2). Après évaporation et reprise à l'éther, le produit est filtré et séché. 6.19 g sont isolés.

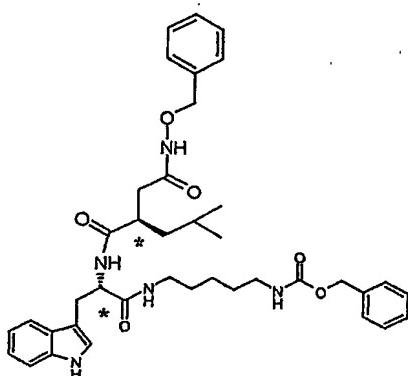
CCM : SiO<sub>2</sub> Merck®; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH-80/20; rf = 0.57 min.

HPLC : Colonne Symmetry® C18; eau-TFA pH 2.90/ CH<sub>3</sub>CN ; tr = 20.8 min.

Spectre de masse :

Mode ES+ m/z = 579 avec z = 1

e) Benzyl (8S)-8-(1H-indol-3-ylmethyl)-(11R)-11-isobutyl-7, 10, 13-trioxo-16-phenyl-15-oxa-6, 9, 14-triazahexadec-1-ylcarbamate



6.11 g du produit obtenu précédemment sont dissous à température ambiante dans 160 ml de tétrahydrofurane. Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C. 1.69 g de O-Benzylhydroxylamine chlorhydrate, 3 ml de triéthylamine, 1.86 g d'Hydroxy-1-benzotriazole hydraté puis 2.63 g de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide chlorhydrate sont successivement ajoutés au milieu réactionnel et l'ensemble est agité 24 heures à température ambiante. L'insoluble est éliminé par filtration. Le filtrat est concentré sous vide. L'huile obtenue est versée dans 200 ml d'eau et l'ensemble est

fortement agité pendant 1 heure à température ambiante. Le précipité obtenu est filtré, broyé finement dans un mortier, puis relavé sous forte agitation dans 100 ml d'eau pendant 30 minutes à température ambiante. Le précipité est filtré et séché sous vide. 5.7 g de produit sont isolés.

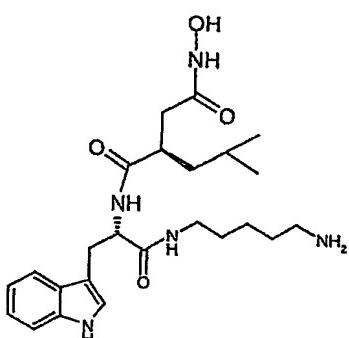
5 CCM :SiO<sub>2</sub> Merck®;CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH-50/50;rf = 0.29 min.

HPLC :Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 2.80/ CH<sub>3</sub>CN ;tr = 22.8 min.

Spectre de masse :

Mode ES+ m/z = 684 avec z = 1

10 f) N<sup>1</sup>-[(1S)-2-[(5-aminopentyl)amino]-1-(1H-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethyl]-N<sup>4</sup>-hydroxy-(2R)-2-isobutylsuccinamide



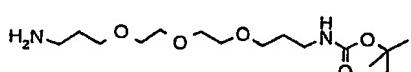
Dans un réacteur de 100 ml muni d'une agitation magnétique, 0.5 g du produit précédent préparé est dissous dans une solution composée de 75 ml d'éthanol et de 50µl d'HCl concentré. 1 g de Pd/C 50% hydraté est ajoutée à la solution. L'ensemble est agité fortement pendant deux heures à température ambiante sous 1 atmosphère d'hydrogène. Le catalyseur est éliminé par filtration sur clarcel. La solution obtenue est filtrée (0.45µ) et le filtrat est concentré sous vide. 0.32 g de produit sont isolés.

15 HPLC :Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 2.80/ CH<sub>3</sub>CN ;tr = 9.90 min.

Spectre de masse :Mode ES+ m/z = 460 avec z = 1

### EXAMPLE 15

a) protection de la diamine



25

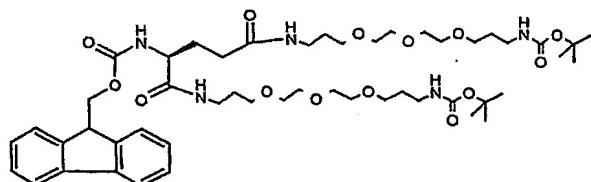
0.113 mol de 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecanediamine est mis en solution dans 200ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. On ajoute à l'aide d'une ampoule à brome une solution de 0.038 mol de ditbutyl-dicarbonate (Boc<sub>2</sub>O) dans 50 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le milieu réactionnel est agité à

température ambiante pendant 18h. Après avoir concentré le milieu réactionnel à 150 mL, la phase organique est lavée avec 2 fois 150 ml d'eau . La phase chlorométhylénique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrée, lavée puis concentrée. L'huile obtenue est purifiée sur silice (AcOEt /MeOH). 5.7g de produit sont obtenus.

5 HPLC :Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 2.80/  $\text{CH}_3\text{CN}$  ;tr = 9.5 min.

Spectre de masse :Mode ES- m/z = 320.9 avec z = 1

b) couplage de l'aminoacide protégé



10

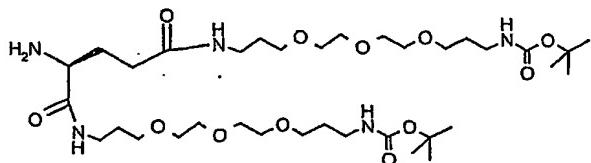
5.4 mmol de N- $\alpha$ -Fmoc-L-Glutamic acid (Fmoc-Glu-OH) sont mis en suspension dans 50 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sous argon . On y ajoute 2éq de N-Hydroxysuccinimide (NHS) puis 2 éq de DiCyclohexylCarbodiimide (DCC) . Le milieu réactionnel est agité pendant 45 min puis filtré. On lave le précipité au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Par ampoule à brome on additionne une solution de 11mmol de composé obtenu précédemment ( étape 15 a) dans 50 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  Le milieu réactionnel est agité à T ambiant pendant 2H. 30 ml d'eau sont ajoutés. On laisse décanter , récupère la phase organique qui est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrée, lavée puis concentrée . au 2/3 . La solution obtenue est purifiée par chromatographie sur  $\text{SiO}_2$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH ). Après évaporation des fractions , on obtient une huile . m=3.8g .

CCM : $\text{SiO}_2$  Merck®;AcOEt/ MeOH-90/10;rf = 0.4 min.

HPLC :Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 2.80/  $\text{CH}_3\text{CN}$  ;tr = 41 min.

Spectre de masse :Mode ES- m/z = 974.6 avec z = 1

25 c) déprotection du Fmoc



1.02 mmol du composé obtenu à l'étape précédente est solubilisé dans 6 ml de  $\text{CH}_3\text{CN}$ . 10 ml de  $\text{CH}_3\text{CN}$  contenant 20% de pipéridine sont ajoutés. Le milieu réactionnel est

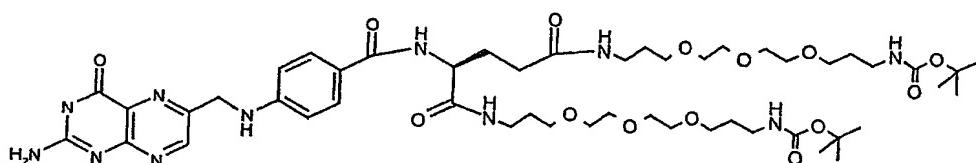
agité à Température ambiante sous argon pendant 3H. Après évaporation du solvant le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur  $\text{SiO}_2$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$ ) Après évaporation des solvants , 0.66g d'huile est obtenu .

CCM: $\text{SiO}_2$  Merck®; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$ -80/20;rf = 0.35.

5 Spectre de masse :

Mode ES+ m/z = 751.5 avec z = 1

d) couplage de l'acide ptéroïque



10

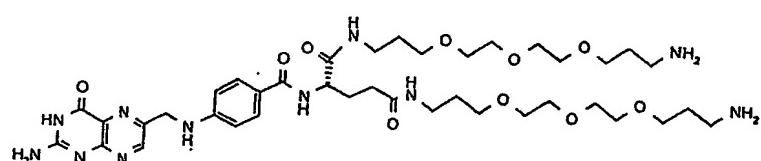
0.8 mmol d'acide ptéroïque est mis en suspension dans 25 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) en présence de 0.8 mmol du composé précédemment préparé. Sous bonne agitation, à Température ambiante, sont ajoutés 75 mg d'hydroxybenzotriazole (HOBT) et 200mg de dicyclohexylcarbodiimide ( DCC ). A l'abri de la lumière , à 40°C, le milieu réactionnel est agité pendant 72H . Le milieu réactionnel est versé dans 250 ml d' $\text{Et}_2\text{O}$ . On obtient une gomme qui est filtrée puis remise en suspension dans 10 ml d'eau . Filtration, lavage à l'eau puis séchage dans un dessicateur sous vide en présence de P2O5 . 320mg de cristaux ambrés sont obtenus

15

HPLC:Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 2.80/  $\text{CH}_3\text{CN}$  ;tr = 34 min.  
Spectre de masse :

Mode ES+ m/z = 1046.5 avec z = 1

e) déprotection:



20

0.28 mmol de composé précédemment préparé est mis en solution dans 5 ml d'acide trifluoroacétique (TFA). Après 15 min d'agitation magnétique à Température ambiante, Le milieu réactionnel est versé dans 25 ml d' $\text{Et}_2\text{O}$ . Le précipité obtenu est filtré, lavé

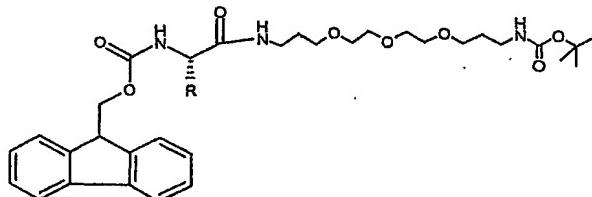
avec Et<sub>2</sub>O puis séché dans un dessiccateur sous vide en présence de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Les cristaux orangés obtenus sont purifiés par HPLC préparative. 110 mg de produit sont obtenus.

HPLC :Colonne Symmetry® C18;eau-TFA pH 2.80/ CH<sub>3</sub>CN ;tr = 11.3 min.

5 Spectre de masse :Mode ES+ m/z = 846.5 avec z = 1

### EXEMPLE 16 SYNTHÈSE PARALLÈLE

a) couplage



10

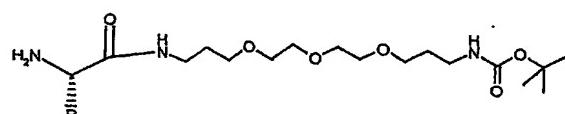
| R= | Formule | Nom  | exemple | HPLC* analytique<br>Tr (mn) | MS<br>m/z |
|----|---------|------|---------|-----------------------------|-----------|
| H  | Gly     | 16-1 |         | 3,4 min                     | 600.4     |
|    | Leu     | 16-2 |         | 3.8 min                     | 656.4     |
|    | Pro     | 16-3 |         | 3,5 min                     | 640.4     |
|    | Ala     | 16-4 |         | 3,5 min                     | 614.4     |
|    | Arg     | 16-5 |         | 4 min                       | 951.5     |
|    | Thr     | 16-6 |         | 4,1 min                     | 700.5     |

|  |     |      |         |       |
|--|-----|------|---------|-------|
|  | Trp | 16-7 | 3,8 min | 729.4 |
|--|-----|------|---------|-------|

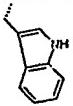
Mode opératoire pour la synthèse de l'exemple 16-4

5 A 685mg de Fmoc-Ala-OH dans 20 ml de dichlorométhane (DCM) sont ajoutés 253mg de NHS puis 454mg de DCC. Le mélange est laissé sous agitation à Température Ambiante pendant 30min. 700mg de composé obtenu exemple 15 a) dilué dans 10ml de dichlorométhane sont ajoutés. Laisser sous agitation à Température Ambiante pendant 1h . Filtrer et laver avec (2x10ml ) d'eau . Après évaporation du DCM, le produit obtenu est purifié par chromatographie sur silice, (DCM / méthanol (95/5)).

## b) déprotection du Fmoc



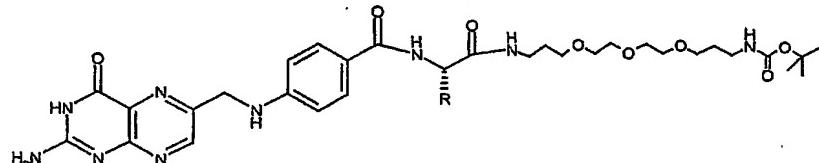
| R= | Formule | Nom  | exemple  | HPLC* analytique<br>Tr (mn) | MS<br>m/z |
|----|---------|------|----------|-----------------------------|-----------|
| H  | Gly     | 16-1 | 1.68 min | 378.3                       |           |
|    | Leu     | 16-2 | 2.02 min | 434.4                       |           |
|    | Pro     | 16-3 | 1.73 min | 418.3                       |           |
|    | Ala     | 16-4 | 1.7 min  | 392.51                      |           |
|    | Arg     | 16-5 | 2.52 min | 729.5                       |           |
|    | Thr     | 16-6 | 2.10 min | 478.4                       |           |

|   |     |      |          |       |
|---|-----|------|----------|-------|
|  | Trp | 16-7 | 2.08 min | 507.4 |
|---|-----|------|----------|-------|

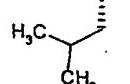
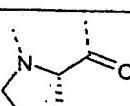
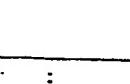
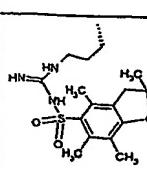
Mode opératoire pour la synthèse de l'exemple 16-4

500mg de composé obtenu à l'étape a) sont introduits dans 5ml d'acétonitrile (ACN),  
 une solution de pipéridine à 20% est ensuite ajoutée et le milieu réactionnel est laissé  
 sous agitation pendant 3h à température ambiante. Le produit obtenu est filtré, lavé à  
 l'ACN et purifié par chromatographie sur silice.

c) couplage de l'acide ptéroïque



10

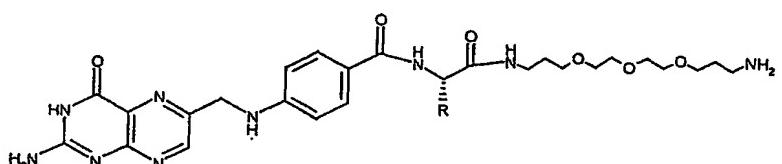
| R =   | Nom | exemple | HPLC* analytique Tr (mn) | MS m/z |
|---|-----|---------|--------------------------|--------|
| H   | Gly | 16-1    | 2.15 min                 | 672.4  |
|  | Leu | 16-2    | 2.57 min                 | 728.5  |
|  | Pro | 16-3    | 2.28 min                 | 712,5  |
|  | Ala | 16-4    | 2.20 min                 | 686.5  |
|  | Arg | 16-5    | 2.95 min                 | 1023.6 |

|  |     |      |          |       |
|--|-----|------|----------|-------|
|  | Thr | 16-6 | 2.73 min | 772.6 |
|  | Trp | 16-7 | 2.55 min | 801.5 |

Mode opératoire pour la synthèse de l'exemple 16-4

A 165.5mg de composé obtenu à l'étape précédente dissous dans 5ml de DMSO ajouter 132mg d'acide ptéroïque, additionner ensuite 57mg d'HOBT et 121.5mg de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide chlorhydrate (EDCI). Laisser le mélange réactionnel sous agitation à 40°C pendant une nuit . Filtrer, laver avec (2x50ml) d'éther diéthylique et (2x20ml) d'eau, centrifuger, récupérer le précipité jaune formé .

## d) déprotection du tBoc



10

| R = | Nom | exemple | HPLC* analytique<br>Tr (mn) | LC/MS<br>m/z |
|-----|-----|---------|-----------------------------|--------------|
|     | Gly | 16-1    | 1.2 min                     | 572,3        |
|     | Leu | 16-2    | 1,7 min                     | 628,3        |
|     | Pro | 16-3    |                             |              |
|     | Ala | 16-4    | 1,4 min                     | 586,3        |
|     | Arg | 16-5    | 0,5 min                     | 671,4        |

|  |     |      |         |       |
|--|-----|------|---------|-------|
|  | Thr | 16-6 | 0,9 min | 616,3 |
|  | Trp | 16-7 | 1,7 min | 701,4 |

\*HPLC = colonne = Symmetry ®C18, 100Å, 3.5µm, L=5cm, d=2.1mm

Eluant : CF<sub>3</sub>COOH dans l'eau ( pH=2.8 ) / CH<sub>3</sub>CN

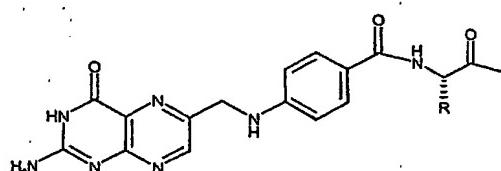
### 5 Mode opératoire pour la synthèse de l'exemple 16-4

le composé obtenu précédemment est déprotégé dans le TFA. Après 30min, précipiter le produit dans l'éther éthylique et laver 3 fois à l'éther éthylique.

### 10 Exemple 17 synthèse parallèle:

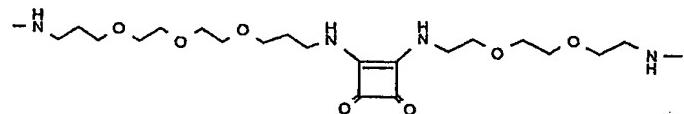
Composé de formule : E

Tel que B=



L=

15

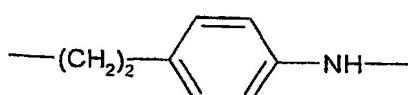


ChFR est tel que r est 2 et I<sub>a</sub> a pour formule H'1 tel que :

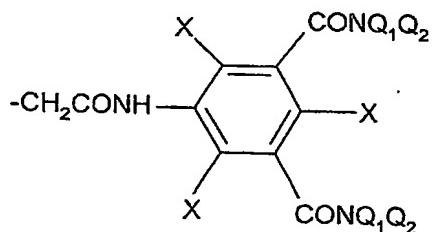
x = 2

20

-GNH- est

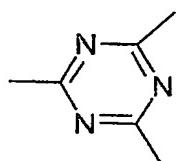


R est



avec  $\text{Q}_1 = \text{Q}_2 = \text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$  et  $\text{X} = \text{Br}$

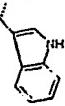
D est



avec  $\text{q}=1$

et  $\text{x}, \text{y}, \text{z}=1$

| R = | Nom | exemple | HPLC** analytique<br>Tr (mn) | MS<br>m/z  |
|-----|-----|---------|------------------------------|------------|
| H   | Gly | 16-1    |                              |            |
|     | Leu | 16-2    | 16                           | 9384 ± 1   |
|     | Pro | 16-3    |                              |            |
|     | Ala | 16-4    | 13,8                         | 9343 ± 0,8 |
|     | Arg | 16-5    |                              |            |
|     | Thr | 16-6    | 13,6                         | 9375 ± 1,7 |

|   |     |      |    |               |
|---|-----|------|----|---------------|
|  | Trp | 16-7 | 18 | 9460 ±<br>1,9 |
|---|-----|------|----|---------------|

\*\* HPLC = colonne = RP select B®, 60Å, 5µm, L=12.5cm, d=4.6mm,

#### Mode opératoire pour la synthèse de l'exemple 16-4

5

1g de composé obtenu exemple 3 est dissout dans 12ml d'eau, le pH est ajusté à 9.2 à l'aide d'une solution de carbonate de sodium. Le composé obtenu à l'étape 16 d) dissous préalablement dans de l'eau est additionné. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 48h à température ambiante. En fin de réaction, le milieu est neutralisé et le produit purifié par chromatographie préparative.

#### EXAMPLE 18

Composé de formule : E

Tel que B=



L= tel que défini exemple 17

ChFR= tel que défini exemple 17

Avec x=1 et y,z=2

20

673 mg de composé préparé exemple 3 sont dissous dans 7 mL d'eau puis le PH est ajusté à 9 avec une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 40 mg de composé obtenu exemple 15 e) en solution dans 1 mL d'acétonitrile sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 24 h à température ambiante puis le pH est ajusté à 6,5 à l'aide d'une solution d'HCl aqueux 25 1N. Le milieu réactionnel est évaporé à sec, sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par HPLC préparative

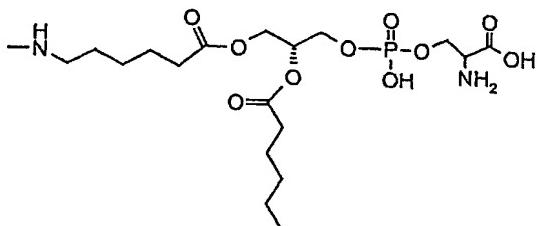
HPLC :Colonne Superphere RP Select B ® ;eau-TFA pH 2.80/ CH<sub>3</sub>CN ;tr = 12.8 min.

Spectre de masse :Mode ES<sup>+</sup> m/z = 18361 avec z = 1

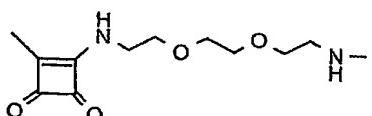
EXEMPLE 19

Composé de formule : E

Tel que B=



5 L=



ChFR= tel que défini exemple 17

Avec x,y,z=1

10 a) condensation

3,3 g de l'intermédiaire obtenu exemple 3 sont dissous dans 33 mL d'eau et le PH est ajusté à 9 avec une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . 271 mg de l'intermédiaire obtenu exemple 12 e) en solution dans 3,3 mL d'acetonitrile sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 24 h à température ambiante puis le pH est ajusté à 5,7 à l'aide d'une solution d'HCL aqueux 1N. Le milieu réactionnel est évaporé à sec, sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par HPLC préparative. 2g de produit sont obtenus.

HPLC :Colonne Superphere RP Select B ® ;eau-TFA pH 2.80/  $\text{CH}_3\text{CN}$  ;tr = 22.8 min.

Spectre de masse :Mode  $\text{ES}^-$  m/z = 9384.8 avec z = 1

- 20

b) déprotection

1,7 g du composé obtenu à l'étape précédente sont dissous dans 30 mL de TFA. Le mélange obtenu est agité à 40°C pendant 3 heures. Cette solution est précipitée dans 300 mL d'éther éthylique. Le précipité est filtré, lavé à l'éther éthylique puis séché. Le produit est repris dans 100 mL d'eau et amené à pH 6,2 par une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$ . Après ultrafiltration sur une membrane de seuil de coupure 1KD, le rétentat est évaporé à sec puis séché sous vide. 1,4 g de produit sont obtenus.

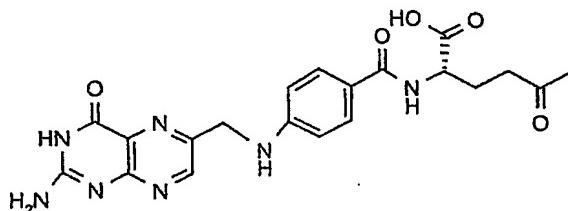
HPLC :Colonne Superphere RP Select B ® ;eau-TFA pH 2.80/  $\text{CH}_3\text{CN}$  ;tr = 15.2 min.

Spectre de masse : Mode ES<sup>-</sup> m/z = 9223.6 avec z = 1

EXEMPLE 20

Composé de formule : E

5 Tel que B=

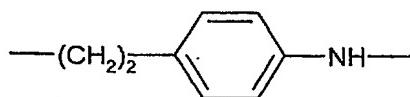


L= tel que défini exemple 17

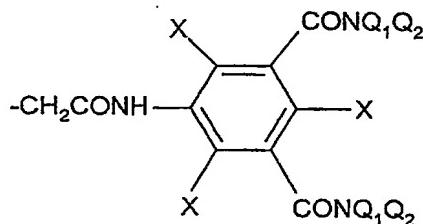
10 ChFR est tel que r est 2 et I<sub>c</sub> a pour formule II'a1 tel que :

$$x = 2$$

-GNH- est

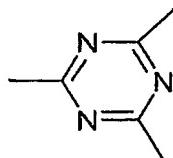


15 R est



avec Q<sub>1</sub> = Q<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>(CHOH)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>OH et X = Br

D est



20

avec q=1

Avec x,y,z=1

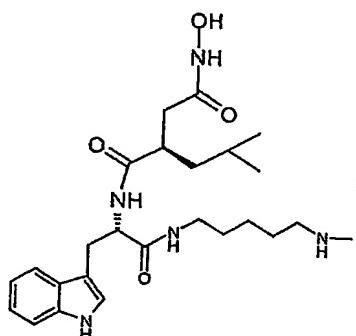
0,92 g de l'intermédiaire obtenu exemple 6 est dissous dans 9 mL d'eau puis une solution saturée de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  est ajoutée afin d'obtenir un pH = 9. 93 mg de l'intermédiaire obtenu exemple 11e) sont ajoutés ainsi que 5 gouttes d'éthanol. Le milieu réactionnel est agité 24 h à température ambiante puis le pH est ajusté à 6,5 à l'aide d'une solution d'HCL aqueux 1N. Le milieu réactionnel est évaporé à sec, sous pression réduite. Le produit obtenu est purifié par HPLC préparative. 400 mg de produit sont obtenus.

10 HPLC:Colonne Superphere RP Select B ® ;eau-TFA pH 2.80/  $\text{CH}_3\text{CN}$  ;tr = 16.6 min.

Spectre de masse :Mode ES<sup>-</sup> m/z = 6987 avec z = 1

### EXEMPLE 21

15 Composé de formule : E Tel que B=



L tel que défini exemple 19

ChFR tel que défini exemple 17

20 x,y,z=1

1.17 g du composé obtenu exemple 3 sont dissous dans 15 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  à température ambiante. Le pH de la solution est amené à 9 par une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . 67.18 mg du produit obtenu étape 14 f) sont ajoutés suivi de 170  $\mu\text{l}$  d'éthanol et le milieu réactionnel est agité à température ambiante en maintenant le pH à 9 à l'aide d'une solution saturée en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pendant 48 heures. Le pH est ramené à 7 par une solution d'HCl et la solution est précipitée dans 150 ml d'éthanol. Le précipité est filtré, lavé par 100 ml

d'éther éthylique, filtré et séché. 1.05 g de produit sont obtenus et purifiés par HPLC préparative.

HPLC :Colonne Symmetry® ;eau-TFA pH 2.80/ CH<sub>3</sub>CN ;tr = 13.7 min.

Spectre de masse :Mode ES<sup>-</sup> m/z = 2303.3 avec z = 4

5

### EXEMPLE 22

Composé de formule : E

Avec B= tel que défini exemple 20

L tel que défini exemple 17

10 ChFR tel que défini exemple 17

x,y,z=1

1.25 g du composé obtenu exemple 3 sont dissous dans 50 ml de carbonate de Sodium (0.1N) à température ambiante. (pH =10). 0.11 g de produit obtenu exemple 11e) sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures. Le mélange est versé dans 500 ml d'éthanol et le précipité obtenu est filtré et séché sous vide. Le produit est purifiés par HPLC préparative. 0.26 g sont isolés .

HPLC :Colonne Supersphere RP Select B ® ;eau-TFA pH 3 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 12.30 min.

20 Spectre de masse :Mode ES<sup>-</sup> m/z = 1879.3 avec z = 5

### EXEMPLE 23- Couplage de peptides

Composé de formule : E

Tel que B= est un peptide parmi ceux proposés dans la table suivante :

| Peptide | Séquence  | cible                    |
|---------|---|--------------------------|
| 1       | -NH-Pro-Leu-Gly-NHOH                                | Matrix metalloproteinase |
| 2       | Cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)                        | αVβ3                     |
| 3       | -NH-Val-Cyclo(Cys-Arg-Gly-Asp-Cys)-NH <sub>2</sub>  | GP <sub>IIb/IIIa</sub>   |
| 4       | -NH-Ado-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-NH <sub>2</sub> | VEGF                     |

25

L tel que défini exemple 19

ChFR tel que défini exemple 17

x,y,z=1

Les peptides ont été préparés selon les méthodes classiques de la littérature en phase liquide ou sur support solide, en chimie Boc ou Fmoc de manière manuelle ou à l'aide d'un synthétiseur automatique.

Les peptides mis en œuvre sont les suivants :

5

| Peptide | Séquence  |
|---------|---|
| 1       | Z-NH-Pro-Leu-Gly-NHOH   |
| 2       | Cyclo(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys)   |
| 3       | NH <sub>2</sub> -Val-Cyclo(Cys-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-Cys)-NH <sub>2</sub>      |
| 4       | NH <sub>2</sub> -Ado-Ala-Thr(tBu)-Trp(Boc)-Leu-Pro-Pro-Arg(Pbf)-NH <sub>2</sub> |

Couplage du peptide 1 avec le composé de l'exemple 3

Composé de formule : E

Tel que B= est -NH-Pro-Leu-Gly-NHOH

10

L tel que défini exemple 19

ChFR tel que défini exemple 17

x,y,z=1

15 a) Débenzylation

1g du peptide Z-Pro-Leu-Gly-NHOH (BACHEM®) sont dissous dans 100 ml de méthanol. 100mg de Palladium sur charbon sont ajoutés. L'ensemble est mis sous hydrogène (40 Psi) à température ambiante pendant 8h (système PARR®). Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur clarcel, concentré par évaporation sous vide puis précipité dans l'éther. Obtention de 570 mg de cristaux blancs.

HPLC :Colonne Symmetry® C18:eau-TFA pH 3.20 / CH<sub>3</sub>CN;tr = 5 min.

Spectre de masse :Mode ES+<sup>+</sup> m/z = 301.3 avec z = 1

b) Couplage

25 50mg du composé obtenu exemple 3 sont dissous dans 1 ml d'eau. Le pH est amené à 9,5 par addition de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 5 mg du peptide obtenu selon l'étape précédente sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 48 heures puis est précipité dans l'éthanol. Le produit obtenu par filtration est ensuite purifié par HPLC préparative.

HPLC:Colonne Superpher RP Select B ® ;eau-TFA pH 3 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 14 min.

Spectre de masse :Mode ES+ m/z = 2265 avec z = 4

Couplage du peptide 2 avec le composé de l'exemple 3

5 Composé de formule : E

Tel que B= est Cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)

L tel que défini exemple 19

ChFR tel que défini exemple 17

x,y,z=1

10

c) Couplage

300mg du composé obtenu exemple 3 sont dissous dans 2 ml d'eau. Le pH est amené à 9,5 par addition de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 56,3 mg du peptide 2 (Cyclo(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys)) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 15 3 jours puis est précipité dans l'éthanol.

HPLC:Colonne SuperpherRP Select B ® ;eau-TFA pH 2.8 H<sub>3</sub>CN ;tr = 7.3 et 19.7

Spectre de masse :Mode ES<sup>-</sup> m/z = 2416.7 avec z = 4

d) déprotection

20 Le composé obtenu selon l'étape c) est dissous dans 10ml du mélange acide trifluoroacétique/eau/triisopropylsilane (90/5/5). Après 4h à température ambiante sous agitation, le TFA est éliminé par évaporation sous vide. Le milieu réactionnel est précipité dans l'ether. Le produit obtenu par filtration est ensuite purifié par HPLC préparative.

25 HPLC:Colonne Superpher Select B ® ;eau-TFA pH 3 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 13.8 min.

Spectre de masse :Mode ES<sup>-</sup> m/z = 2339.3 avec z = 4

Les autres composés sont obtenus de manière analogue :

30 Couplage du peptide 3 avec le composé de l'exemple 3:

Au départ du peptide 3 (NH<sub>2</sub>-Val-Cyclo(Cys-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-Cys)-NH<sub>2</sub>) et du composé de l'exemple 3 selon le mode opératoire de l'étape 'c) de l'exemple 23.

Déprotection selon le mode opératoire de l'étape d) de l'exemple 23.

Couplage du peptide 4 avec le composé de l'exemple 3:

Au départ du peptide 4 ( $\text{NH}_2\text{-Ado-Ala-Thr(tBu)-Trp(Boc)-Leu-Pro-Pro-Arg(Pbf)-NH}_2$ ) et du composé de l'exemple 3 selon le mode opératoire de l'étape c) de l'exemple 23.

- 5 Déprotection selon le mode opératoire de l'étape d) de l'exemple 23.

Couplage du peptide 1 avec le composé de l'exemple 10:

Au départ du composé de l'étape a) de l'exemple 23 et du composé de l'exemple 10 selon le mode opératoire de l'étape b) de l'exemple 23.

Couplage du peptide 2 avec le composé de l'exemple 10:

10 Au départ peptide 2 (Cyclo(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys)) et du composé de l'exemple 10 selon le mode opératoire de l'étape c) de l'exemple 23.

Déprotection selon le mode opératoire de l'étape d) de l'exemple 23.

Couplage du peptide 3 avec le composé de l'exemple 10:

15 Au départ du peptide 3 ( $\text{NH}_2\text{-Val-Cyclo(Cys-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-Cys)-NH}_2$ ) et du composé de l'exemple 10 selon le mode opératoire de l'étape c) de l'exemple 23.

Déprotection selon le mode opératoire de l'étape d) de l'exemple 23.

Couplage du peptide 4 avec le composé de l'exemple 10:

20 Au départ du peptide 4 ( $\text{NH}_2\text{-Ado-Ala-Thr(tBu)-Trp(Boc)-Leu-Pro-Pro-Arg(Pbf)-NH}_2$ ) et du composé de l'exemple 10 selon le mode opératoire de l'étape c) de l'exemple 23.

Déprotection selon le mode opératoire de l'étape d) de l'exemple 23.

Couplage du peptide 1 avec le composé de l'exemple 6:

25 Au départ du composé de l'étape a) de l'exemple 23 et du composé de l'exemple 6 selon le mode opératoire de l'étape b) de l'exemple 23.

Couplage du peptide 2 avec le composé de l'exemple 6:

Au départ peptide 2 (Cyclo(Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys)) et du composé de l'exemple 6 selon le mode opératoire de l'étape c) de l'exemple 23.

Déprotection selon le mode opératoire de l'étape d) de l'exemple 23.

Couplage du peptide 3 avec le composé de l'exemple 6:

30 Au départ du peptide 3 ( $\text{NH}_2\text{-Val-Cyclo(Cys-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-Cys)-NH}_2$ ) et du composé de l'exemple 6 selon le mode opératoire de l'étape c) de l'exemple 23.

Déprotection selon le mode opératoire de l'étape d) de l'exemple 23.

Couplage du peptide 4 avec le composé de l'exemple 6:

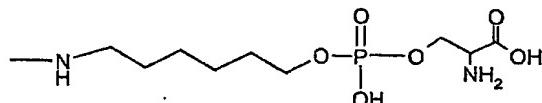
Au départ du peptide 4 ( $\text{NH}_2\text{-Ado-Ala-Thr(tBu)-Trp(Boc)-Leu-Pro-Pro-Arg(Pbf)-NH}_2$ ) et du composé de l'exemple 6 selon le mode opératoire de l'étape c) de l'exemple 23.

5 Déprotection selon le mode opératoire de l'étape d) de l'exemple 23.

EXEMPLE 24

Composé de formule : E

Tel que B=



L tel que défini exemple 19

ChFR= tel que défini exemple 17

Avec x,y,z=1

15

a) condensation

La condensation est réalisée au départ du composé de l'exemple 3 et de l'intermédiaire obtenu exemple 13 c) selon le mode opératoire de l'exemple 19 a).

20

b) déprotection

Le composé obtenu à l'étape précédente est dissous dans le TFA et traité selon le mode opératoire décrit étape 19 b).

EXEMPLE 25

25 Composé de formule : E

Avec B= tel que défini exemple 20

L tel que défini exemple 17

ChFR est tel que r est 2 et I<sub>e</sub> a pour formule II'''1 tel que :

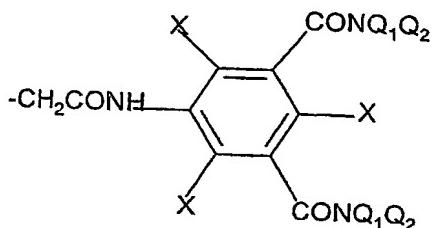
x=2

30

-GNH- est

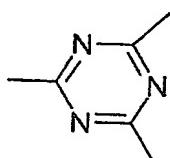
- $(-\text{CH}_2)_3\text{-NH-}$

R est



avec Q<sub>1</sub> = Q<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>(CHOH)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>OH et X = Br

D est



5

avec q=1

Avec x,y,z=1

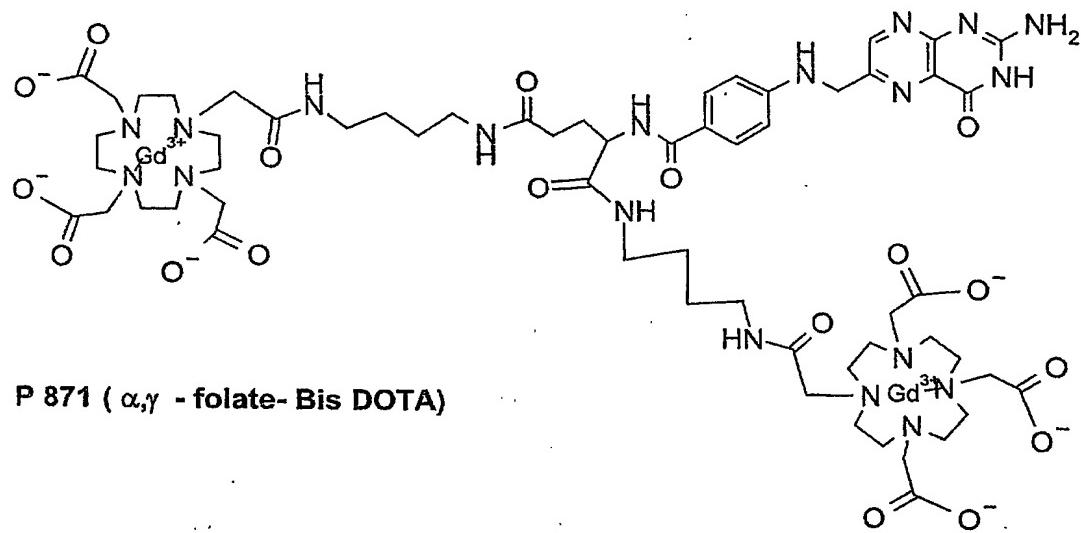
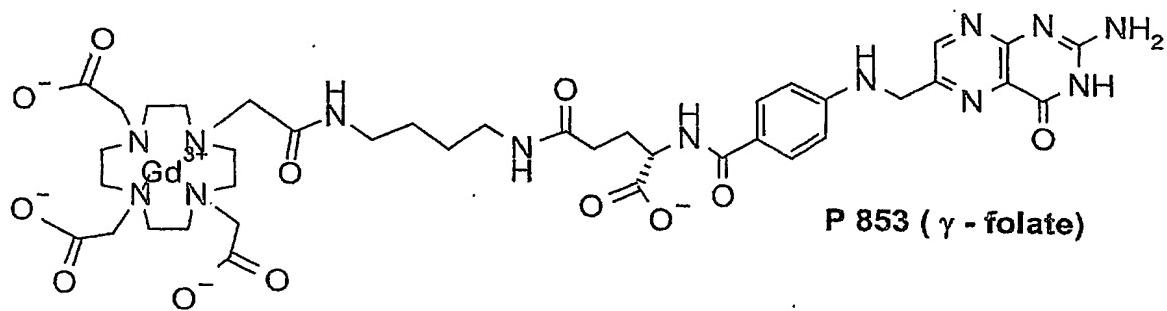
- 10 0,650 g du composé obtenu à l'exemple 10, est dissous dans 9 ml d'eau ; le pH est amené à 9,2 par Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> puis 0,065 g de composé préparé à l'exemple 11 e) sont rajoutés ainsi que 0,3 ml d'éthanol. La solution est laissée deux jours à température ambiante puis versée dans 90 ml d'éthanol. Le produit obtenu est filtré puis séché. Après purification par HPLC préparative et ultrafiltration sur une membrane avec un seuil de coupure de 1KD ; le rétentat est concentré. Obtention de 200mg de paillettes jaunes.
- 15

HPLC :Colonne Superphere RP Select B ® ;eau-TFA pH 2.8 / CH<sub>3</sub>CN ;tr = 12 min.  
Spectre de masse :Mode ES- m/z = 2305.6 avec z = 4

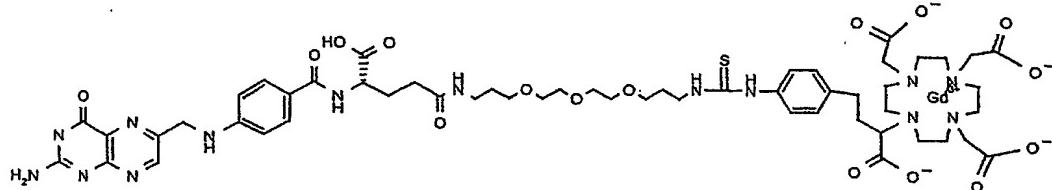
- 20 On décrit maintenant l'efficacité biologique de composés synthétisés par les inventeurs..

EXEMPLE I) : composés FR utilisant comme biovecteur un agent de ciblage de récepteur aux folates.

- 25 Les inventeurs ont notamment testé comme témoins des biovecteurs non FR :  
a. des composés commerciaux P853 et P871 associant un folate et un DOTA non FR



- le composé P860 de formule

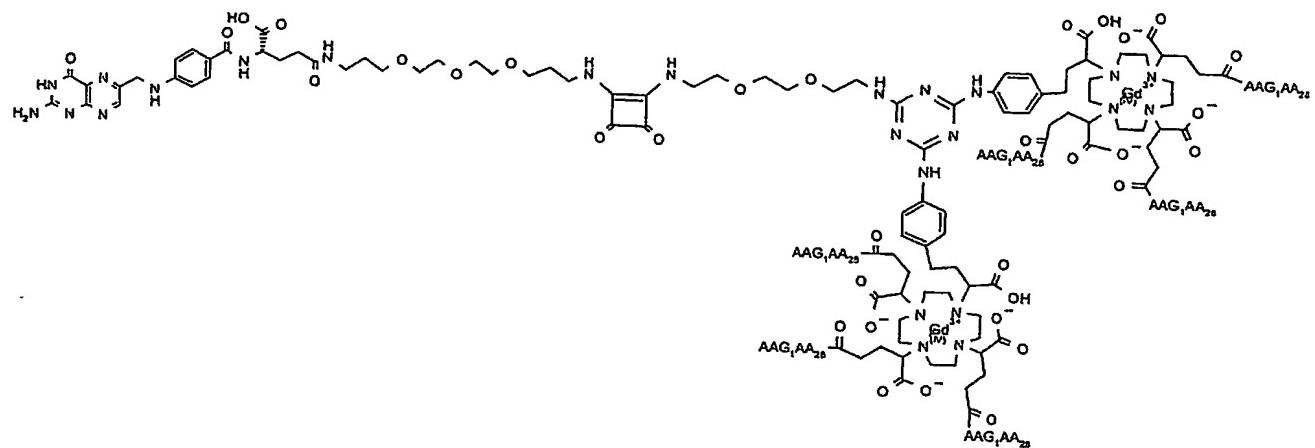


5

Le P860 associe un biovecteur spécifique de ciblage du récepteur au folate, et un DOTA non FR, avec un lien de type PEG.

Les inventeurs ont notamment testé comme biovecteurs FR:

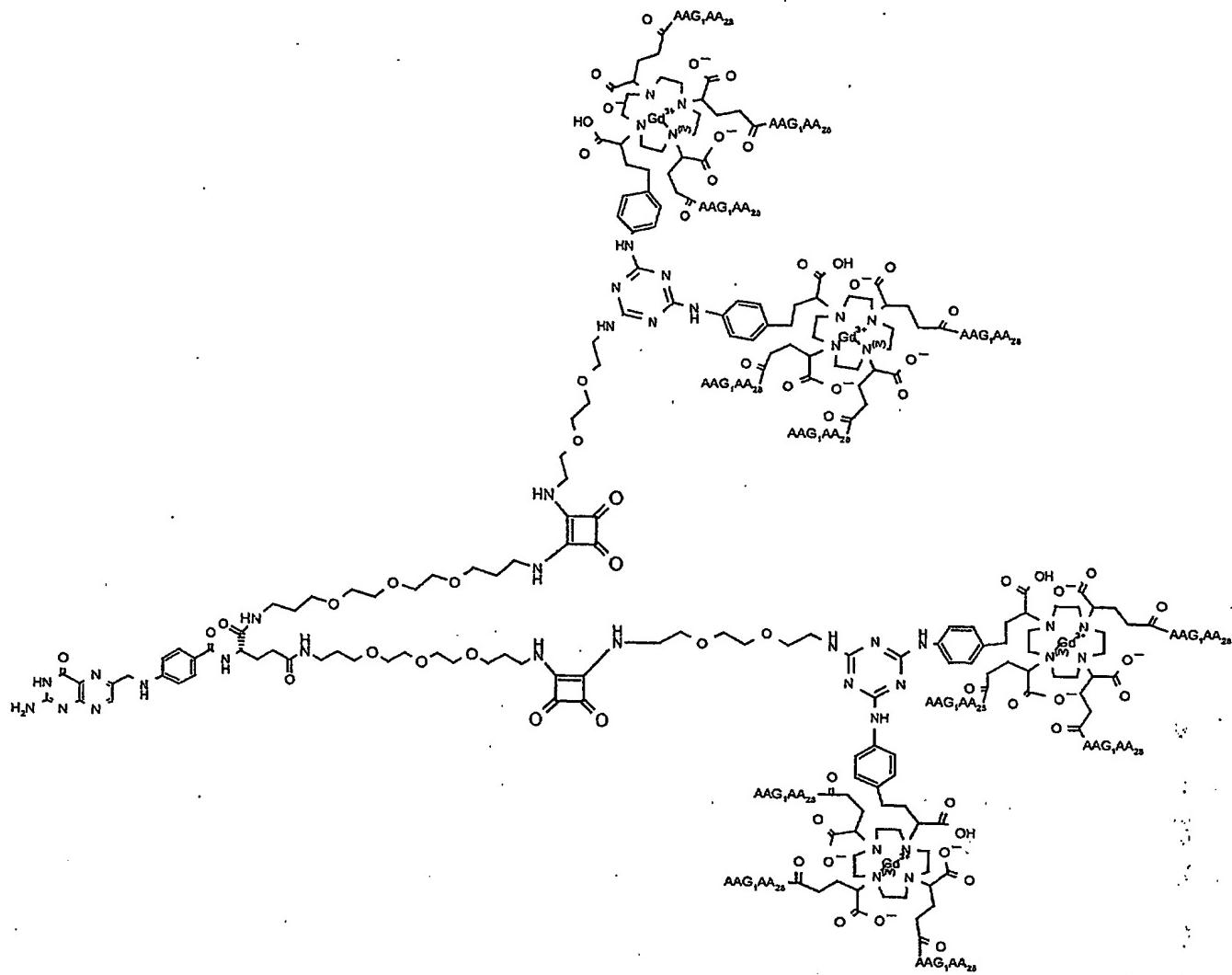
10 - le composé BIO-FOLATE.I de formule :



- Le BIO-FOLATE.I associe un biovecteur spécifique de ciblage du récepteur au folate, et un DOTA FR, avec un lien de type squarate.
- Le BIO-FOLATE.I possédant 2 Gd par mole de produit, les valeurs de relaxivité molaire sont résumées dans ce tableau (incertitude +/- 5 %).

| Fréquence |  | r1 molaire<br>mM-1.s-1 | r2 molaire<br>mM-1.s-1 |
|-----------|--|------------------------|------------------------|
| 60 MHz    |  | 53                     | 81                     |

b. le composé BIO-FOLATE.II de formule



Les inventeurs ont vérifié que les composés témoins possèdent une forte affinité

pour leur récepteur in vitro. La fixation a été testée sur modèle in vitro de binding sur membranes de cellules KB en compétition avec du folate  $^{3}\text{H}$ .

Par contre les études in vivo démontrent clairement que le P860 est inactif in vivo contrairement au BIO-FOLATE.I et au BIO-FOLATE.II.

c. Etude de Biodistribution sur souris Nudes portant des tumeurs KB : cette étude de biodistribution comprenait une compétition entre le P860 et l'acide folique libre. Un groupe d'animaux recevait une nourriture normale et une co-injection d'acide folique avec le produit testé et un autre placé en alimentation déplétée en folate pour une injection unique du produit testé. Cette étude montre une absence de fixation du P860 sur la FBP.

d. IRM sur rats Nudes porteurs de tumeurs KB (étude permettant une comparaison de P860 et du Dotarem sur le modèle rat Nude porteur d'une tumeur KB) : une absence de différence visuelle entre les produits au niveau de la tumeur est observée.

- 5 Au contraire, les études sur le produit BIO-FOLATE.I donnent des résultats positifs :
- Etude in vitro de binding de produit sur de la FBP (Folate Binding Protein): cette étude a permis de montrer que le BIO-FOLATE.I se fixe de façon spécifique sur la FBP .
  - Etude in vitro de la fixation / internalisation dans les cellules KB : cette étude réalisée à 10 37°C avec ou sans acide folique libre en excès a permis de tester la quantité de produit spécifiquement fixée et internalisée dans les cellules KB par dosages en ICP-MS. On constate une bonne capture de ce produit à 37°C, ce qui est en accord avec les expériences précédentes, et démontre la spécificité par les expériences d'inhibition.
  - Etude de biodistribution sur souris Nudes portant des tumeurs KB
- 15 La concentration choisie pour le BIO-FOLATE.I est de 15 µmol/kg, ce qui est dans la zone de doses d'efficacité en imagerie chez l'homme  
Résultats : une excellente accumulation de BIO-FOLATE.I dans les tumeurs est observée. Une injection préalable d'acide folique libre à 25 µmol/kg permet de diminuer les concentrations de Gd dosées dans les tumeurs montrant la spécificité du produit.
- 20 La relaxivité du BIO-FOLATE.I molaire dans l'eau est très bonne notamment à 60 MHz :  $r_1 = 53 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . On rappelle que la relaxivité obtenue avec des produits spécifiques de l'art antérieur de type dendrimères associés à des folates est  $r_1 = 9.32 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  par Gd (Investigative Radiology, jan 2000, vol 35, p56).
- 25 - Etude d'imagerie IRM entre 30 minutes et 24 heures : le contraste au niveau de la tumeur est très net, notamment 1 à 2 heures après injection. De plus, des dosages de Gd en ICP-MS ont été effectués sur les organes de référence à la fin des essais sous imageur. Ces expériences montrent par exemple que le BIO-FOLATE.I induit un rehaussement des tumeurs et que celui-ci est plus durable qu'avec des produits de l'art antérieur. Le ratio Tumeur / Muscle est de l'ordre de 4 à 10 fois celui observé avec des 30 produits de contraste précédemment utilisés.

Conditions expérimentales des études BIACORE 3000 sur P860 et BIO-FOLATE.I (étude d'affinité entre P860; BIO-FOLATE.I, et la Folate Binding Protein par BIACore 3000).

5 Réactifs

| Produits      | Fournisseur | Référence |
|---------------|-------------|-----------|
| Acide folique | Avogado     | 14300     |
| FBP           | Sigma       | F-0504    |
| Chips CM5     | BIACore     | Lot 0374  |

Tampon HBS : Hepes 10mM pH7,4, NaCl 0,15M, EDTA 4,3mM et NP20 à 0,005%

Tampon PGM : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM pH 7, glycérol 10% et β-mercaptoproéthanol 4mM

- 10 L'immobilisation de la FBP a été faite à 1 mg/ml dans le tampon PGM selon les protocoles prescrits par BIACore pour le couplage aux amines. Après, les groupements carboxylés actifs restants sont saturés par 1M d'éthanolamine pH=8.
- La fixation du folate a été suivie à quatre concentrations différentes (125, 250, 500 et 1000 µM). L'association et la dissociation ont été étudiées avec un flux à 30 µl/min. La phase d'association est de 5 minutes alors que la phase de dissociation est de 3 minutes.
- 15

Résultats

| Produits      | Vitesse de dissociation Kdi          |
|---------------|--------------------------------------|
| Acide Folique | $1,55 \pm 0,44 \cdot 10^{-3} s^{-1}$ |
| BIO-FOLATE.I  | $2,6 \pm 1,4 \cdot 10^{-4} s^{-1}$   |

20 Conditions d'étude de biodistribution sur souris Nude

Partie 1 :

- Induction de tumeurs sous-cutanées chez la souris femelle *Nude* et injection IV de cellules humaines KB.
- Séparation des animaux en 2 groupes recevant une alimentation avec ou sans folate (10 jours).

25 Le groupe avec folate reçoit une injection supplémentaire d'acide folique (25 µmol/kg IV) 5 minutes avant les injections de produit de contraste (PC).

- Injection IV de PC puis prélèvements d'organes (muscle, tumeur, foie, reins) et de plasma.

#### Partie 2 : Dosages par ICP-AES

- Dosage du Gd (P860, BIO-FOLATE.I, Dotarem) : foie, rein.

#### 5 Partie 3 : Bioanalyse : Dosages par ICP- MS

- Dosage du Gd (P860, BIO-FOLATE.I, Dotarem) : tumeur, muscle, plasma

#### Supplémentation en folate

10 Acide folique 5.5 mM dilué dans du PBS puis injecté à la dose de 25 µmol/kg (4.54 ml/kg).

#### Produits de contraste

| Produit      | Véhicule | Concentration en Gd (mM) | Concentration après dilution (mM). |
|--------------|----------|--------------------------|------------------------------------|
| P860         | PBS 1X   | 50                       | 44                                 |
| BIO-FOLATE.I | PBS 1X   | 10 à 15                  | 6.6                                |
| DOTAREM      | PBS 1X   | 500                      | 44                                 |

#### Mode d'administration

15 Acide folique et PC : Voie IV (veine caudale).

L'acide folique a été injecté 5 minutes avant l'injection de PC.

#### Cellules tumorales

| Lignée cellulaire | Type                               | Origine | Référence                                      |
|-------------------|------------------------------------|---------|--|
| KB                | Nasopharyngeal epidermal carcinoma | Humaine | Prélevée chez un adulte mâle caucasien en 1954 |

Cellules KB cultivées en RPMI 1640 + 10% de SVF.

#### Induction des tumeurs sous-cutanées :

- J0 : inoculation sous-cutanée de 107 cellules KB diluées dans 200 µl de RPMI, dans le flanc droit des animaux sous anesthésie gazeuse à l'Isoflurane.
- J18 : 100% des animaux ont développé une tumeur sous-cutanée.

Résultats : distribution tumorale des PC-Gd

- Régime sans folate

On retrouve de 14% (à 4 h) à 7% (à 72 h) de la dose théorique injectée de BIO-FOLATE.I, dans les tumeurs.

5 Dans le cas du P860, on ne retrouve que 1 à 2 % de la dose théorique injectée, dans les tumeurs.

Ces proportions sont conservées lorsqu'elles sont pondérées par la masse de l'échantillon tumoral : respectivement 0.3 à 0.4% pour le BIO-FOLATE.I versus 0.05 à 0.10% pour le P860.

10 Pour les deux PC, on observe un effet-temps entre 4 et 72 h caractérisé par une décroissance progressive des quantités de PC mesurées dans les tumeurs.

- Compétition par du folate libre

15 L'acide folique empêche partiellement l'accumulation du BIO-FOLATE.I dans les tumeurs, aux temps 4 et 24 h : on retrouve alors 2 fois moins de produit (5 à 8% de la dose injectée) au niveau tumoral.

Au contraire, la distribution du P860 dans les tumeurs n'est pas affectée par la présence de folate libre.

20 - Distribution tumorale du PC de référence (DOTAREM)

Avec le régime déplété en folate, on retrouve 1 à 2% de la dose théorique injectée de Dotarem dans les tumeurs.

Comme pour le P860 et le BIO-FOLATE.I, on observe un effet-temps entre 4 et 72 h (décroissance du taux retrouvé).

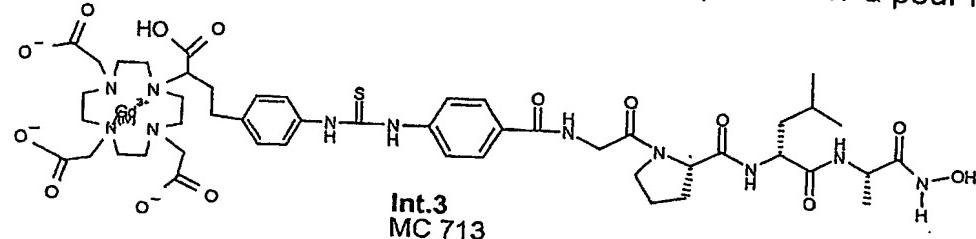
25 Lorsqu'elles sont rapportées en g de tissu, on constate que les quantités intratumorales de Dotarem deviennent négligeables au-delà de 4 h.

EXEMPLE II) Composés FR utilisant comme biovecteur un inhibiteur de MMP .

30

Le DOTAREM (sel du DOTA Gd) est un produit témoin dit non spécifique, ne comportant pas de biovecteur. Deux composés gadolinés, vectorisés par un biovecteur inhibiteur de MMP ont été testés :

- le P947 (composé BIOVECTEUR non FR) qui associe un biovecteur spécifique inhibiteur de MMP et un DOTA non FR ; le composé P947 a pour formule :



- le P967 (composé BIOVECTEUR FR) qui associe un biovecteur spécifique pseudopeptide inhibiteur de MMP et un DOTA FR ; le composé P967 à la différence du P947 comporte un DOTA FR.

#### TESTS IN VITRO

Les inventeurs ont testé l'activité *in vitro* des produits de contraste P947 et P967 chélates de Gadolinium fonctionnalisés par des inhibiteurs des métalloprotéases de la matrice (MMPs), sur les MMP-1 et MMP-3 humaines. Les témoins en ce qui concerne l'affinité sur le récepteur de la partie biovecteur ont été deux peptides :

Tripeptide commercial: Z-Pro-Leu-Gly-NHOH (Bachem), appelé peptide A dans l'étude (inhibiteur de MMP-1)

Tétrapéptide commercial: 4-Abz-Gly-Pro-Dieu-Dala-NHOH (Bachem), appelé peptide B dans l'étude (inhibiteur de MMP-1, MMP-2 et MMP-3)

Les inventeurs ont vérifié que les valeurs obtenues pour les peptides sont proches des valeurs décrites dans la littérature et démontré que le fait de greffer un peptide sur une sonde Gd n'altère pas l'activité inhibitrice du peptide.

Plus précisément, l'évaluation de l'activité MMP inhibitrice *in vitro* a été réalisée de la manière suivante.

1. Incubation du produit à tester en présence de l'enzyme MMP, à 37°C, pendant un temps défini, puis mesure de la fluorescence du milieu (t=0).
2. Induction de la réaction enzymatique par addition du substrat (qui devient fluorescent lorsqu'il est coupé par l'enzyme), puis incubation à 37°C, pendant 40 min. Une deuxième mesure de fluorescence est ensuite réalisée (t=40).
3. L'activité de l'enzyme MMP est déterminée par soustraction du signal mesuré par fluorimétrie : (t=40) – (t=0).

4. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme contrôle.

5. Le produit inhibiteur standard est le TIMP-1.

Les produits ont été testés en duplicate, à  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-9}$  M en peptides. Ceux qui ne comportaient pas de peptides ont été traités de façon similaire aux produits de contraste fonctionnalisés correspondants.

MMP-1 :

| PRODUITS  | CONCENTRATION EN PEPTIDE | EFFET INHIBITEUR SIGNIFICATIF | IC50 DU PEPTIDE (LITTÉRATURE) |
|-----------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| PEPTIDE A | $> 10^{-5}$ M            | N.D.                          | $4 \times 10^{-5}$ M          |
| PEPTIDE B | $10^{-5}$ M              | 46%                           | $10^{-6}$ M                   |
| P947      | $10^{-5}$ M              | 86%                           | $10^{-6}$ M                   |
| P967      | $10^{-6}$ à $10^{-10}$ M | > 50%                         | $10^{-6}$ à $10^{-10}$ M      |

10 Les inventeurs ont aussi testé l'activité *in vitro* pour évaluer l'activité inhibitrice du P947 et du tétrapeptide sur MMP-2, une gélatinase A exprimée de façon constitutive dans la paroi vasculaire et surexprimée en cas d'inflammation.

15 Témoin : tétrapeptide commercial (appelé peptide B dans l'étude) : 4-Abz-Gly-Pro-Dleu-Dala-NHOH (Bachem) ; inhibiteur de MMP-1, MMP-2 et MMP-3. Expérimentalement, le tétrapeptide possède une activité inhibitrice significative sur MMP-2 à partir de  $10^{-5}$  M ; ce résultat est en accord avec les données de la littérature (IC<sub>50</sub> du tétrapeptide commercial sur MMP-2 =  $3 \times 10^{-5}$  M). De plus, le greffage du tétrapeptide sur un chélate gadoliné ne change pas son effet vis-à-vis de MMP-2, puisqu'on obtient des résultats analogues avec le P947.

20 En conclusion des tests *in vitro*, les composés connus de l'art antérieur (biovecteur associé à chélate non FR), et les composés FR obtenus par les inventeurs montrent une spécificité conservée.

Le protocole détaillé est le suivant pour les MMP2 : le produit testé est ajouté à un tampon 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM NaCl<sub>2</sub>, 0.02%NaN<sub>3</sub>, 0.05% Brij@35, 0.35 µM MMP(2 activée par incubation 120 minutes à 37°C avec 6.67 mM APMA. L'intensité de fluorescence est mesurée après préincubation 30 minutes à 37°C,

à lambda ex=340 nm et lambda em = 405 nm. La réaction enzymatique est initiée par addition de 6 µM NFF-2 avec incubation ensuite 90 minutes à 37°C.

5 III) Composés FR utilisant comme biovecteur la phosphatidylsérine.

III.1 Etudes in vitro

La validation in vitro a été réalisée en comparant, le taux de capture par des macrophages activés vs non activés (les THP-1 activées sont positives pour le récepteur PS). Cette étude a permis de mettre en évidence l'interaction de la phosphatidylserine-NBD (PS-NBD) fluorescente avec la lignée THP-1. La PS-NBD est une phosphatidylserine ne comprenant qu'une chaîne grasse, l'autre bras relié à la tête sérine supportant le marqueur NBD de fluorescence.

10 La lignée cellulaire THP-1 est une lignée monocyttaire humaine qui, après activation, se différencie en macrophage et exprime le récepteur à la phosphatidylsérine. Ces cellules ont été cultivées en présence de phosphatidylsérine-NBD.

PS-NBD : 810192 Avanti Polar-Lipids (COGER)

20 Protocole avec cytomètre de flux

- Ensemencement de 2 mL d'une suspension de THP-1 à  $10^6$  C/mL en plaque 6 puits.

- Activation de THP-1 pendant 24 heures avec 50 nmol/L de PMA.

- Incubation de 700 µL de chacune des dilutions pendant 24 heures. (à partir de la solution à 6,25 mmol/L)

- Aspiration de l'excès de produit.

- Lavage du tapis avec 1 mL de RPMI sans rouge de phénol.

- Aspirer l'excès.

- Remettre en suspension les cellules dans 1 mL de PBS. (décrochement des cellules à l'aide d'un flux de milieu sur le tapis puis grattage à l'aide d'un râteau des cellules n'étant pas décrochées)

- Maintien des cellules dans le noir à 4°C en attendant la lecture.

- Lecture de la fluorescence en FL1 à 525 nm en cytométrie de flux.

Gamme testée de PS-NBD : 13, 32 et 64 µM

Témoins : THP-1

Groupes tests : THP-1/PMA, THP-1/PS-NBD à 5 µM.

Résultats : le rapport entre témoin négatif et concentration la plus élevée est supérieur à un facteur 50

5

### III.2 Etude ex vivo.

Les résultats *ex vivo* montrent une interaction entre macrophages primaires de lapins WHHL et la phosphatidylsérine-NBD (PS-NBD). En effet, des macrophages ont été isolés à partir d'échantillons de crosse aortique et de ganglions mésentériques, puis incubés 18 h *ex vivo* en présence de PS-NBD. L'analyse de ces cellules par microscopie à fluorescence a montré une forte accumulation intracellulaire de la PS-NB. Plus précisément : le lapin a été exsanguino-perfusé à l'aide de sérum de veau nouveau né hépariné avant d'être sacrifié. La crosse aortique, l'aorte thoracique et l'aorte abdominale ont été prélevées. Les tissus prélevés ont été incubés pendant 18 heures en milieu de culture cellulaire additionné de PS-NBD puis montés en bloc congelés pour la réalisation de coupes histologiques. Certaines coupes ont été observées en microscopie à fluorescence et d'autres ont été immunomarquées à l'aide d'un anticorps anti-macrophage de lapin (RAM 11)

#### 20 Incubation des tissus avec la PS-NBD

- Incubation des prélèvements à 37°C dans des plaques 24 trous en présence de PS-NBD à 35 µM pendant 18 heures.
- 2 rinçages des artères en PBS.
- Inclusion de chaque morceau d'aorte dans un gel à congélation.
- Cryofixation.
- Conservation des pièces dans le congélateur – 80°C.

#### Immunohistochimie (HEGP)

- L'anticorps primaire de souris Ram 11 est utilisé dilué au 1/100.
- L'anticorps secondaire (chèvre anti-souris) est couplé à la phosphatase alcaline.
- Le chromogène utilisé est l'ADC (fournit par AbCys).
- Une contre coloration est réalisée au Fast re

En immunohistochimie, des macrophages ont été mis en évidence dans toutes les coupes

Les inventeurs ont en outre démontré *ex-vivo* la distribution de la PS-NBD dans les plaques d'athérome de souris ApoE-KO. Pour cela, des prélèvements de cœur comprenant valves et crosse aortique ainsi que la bifurcation iliaque seront incubés en présence de PS-NBD. Cette étude a permis de démontrer que la phosphatidylsérine

5 interagit spécifiquement avec les macrophages localisés dans les plaques.

Les inventeurs ont en outre démontré (étude comparative entre cellules KB négatives et cellules THP1 positives) que la reconnaissance de la PS-NBD par le récepteur de la phosphatidylsérine exprimé à la surface des macrophages activés passe effectivement par la sérine-phosphate (groupement polaire) et non par les chaînes grasses. Pour cela, on a réalisé les mêmes essais avec la PS-NBD d'une part et la NBD-PS

10 (marqueur de fluorescence lié à la tête sérine et non aux chaînes grasses) d'autre part, à la fois *ex-vivo* et *in vitro* (sur des cellules THP1 activées).

*In vitro*, sur cellules THP1 (activées vs non activées), les inventeurs ont testé un composé de formule (E) avec B un dérivé PS, le chélate FR étant identique à celui utilisé pour le BIO-FOLATE.I, et montré la fixation et/ou l'accumulation significativement

15 supérieure dans le groupe THP1 activées positives.

## REVENDICATIONS

1. Composés de formule générale suivante (E) :



5 dans laquelle :

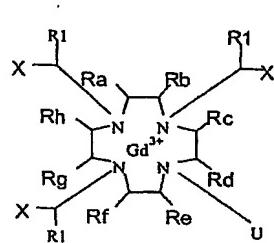
- B est un biovecteur
- L est un lien
- Ch FR représente un chélate de formule (I) :



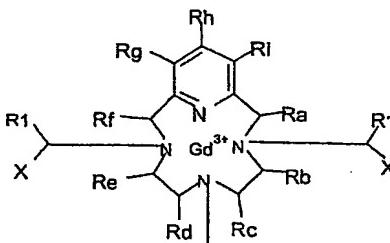
10 Avec :

a)  $I_{a,b,c,d,e,f,g}$  choisi parmi  $I_a$ ,  $I_b$ ,  $I_c$ ,  $I_d$ ,  $I_e$ ,  $I_f$ ,  $I_g$ ,

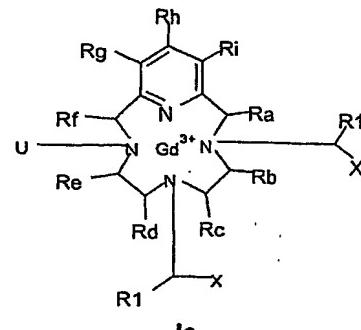
$I_a$ ,  $I_b$ ,  $I_c$  ayant les significations :



15 Ia



Ib



Ic

où :

- les X, identiques ou différents, sont choisis parmi  $CO_2R'_a$ ,  $CONR'_bR'_c$  ou  $P(R'_d)O_2H$ , avec :

20  $R'_a$ ,  $R'_b$ ,  $R'_c$  identiques ou différents représentant H ou (C1-C8) alkyle, éventuellement hydroxylé ;

$P$  est l'atome de phosphore,  $R'_d$  est choisi parmi OH, (C1-C8) alkyle ou (C1-C8) alkoxy, (C1-C8) arylalkyle ou (C1-C8) alkoxyalkyle ;

- R1 représente un groupe hydrophile de poids moléculaire supérieur à 200, sélectionné parmi des groupes :

25 - polyoxy (C2-C3) alkylène, notamment le polyéthylène glycol et ses monoéthers et monoesters en C1 à C3, de masse moléculaire de préférence de 1000 à 2000

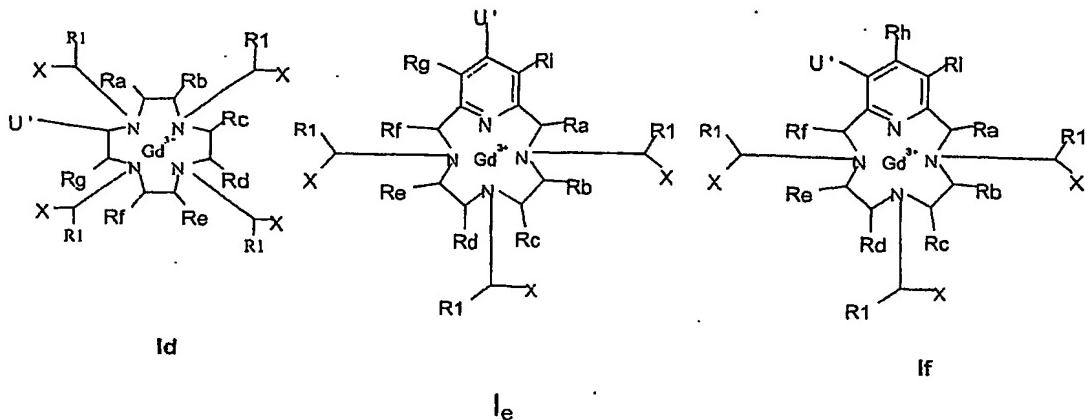
- Polyhydroxyalkyle

- Polyol

-  $(R_2 g)_e [ (R_2 g)_i R_3]_h$  où :

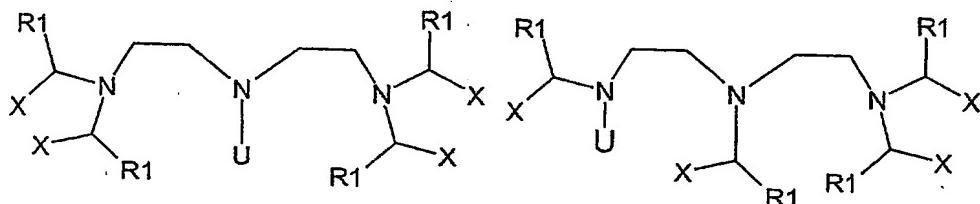
- $h = 1$  ou  $2$  ;  $i = 0, 1$  ou  $2$  ;  $e = 1$  à  $5$
- $R_2$  représente (les  $R_2$  étant identiques ou différents) :
  - rien, un alkylène, un alkoxyalkylène, un polyalkoxyalkylène ;
  - un phényle, ou un reste hétérocyclique saturé ou non, éventuellement substitué par OH, Cl, Br, I, (C1-C8)alkyle, (C1-C8)alkyloxy, NO<sub>2</sub>, NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, NR<sub>x</sub>COR<sub>y</sub>, CONR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, COOR<sub>x</sub>, R<sub>x</sub> et R<sub>y</sub> étant H ou (C1-C8)alkyle, et les groupes alkyle, alkylène, alkoxy, en C1 à C14 linéaires, ramifiés ou cycliques pouvant être hydroxylés ;
  - g représente (les g étant identiques ou différents) : rien ou une fonction O, CO, OCO, COO, SO<sub>3</sub>, OSO<sub>2</sub>, CONR', NR'CO, NR'COO, OCONR', NR', NR'CS, CSNR', SO<sub>2</sub>NR', NR'SO<sub>2</sub>, NR'CSO, OCSNR', NR'CSNR', P(O)(OH)NR', NR'P(O)-(OH), dans laquelle R' est H (C1-C8)alkyle ou R<sub>3</sub> ;
  - R<sub>3</sub> représente alkyle, phényle, alkyle substitué ou interrompu par un ou des groupes phényles, alkylèneoxy; amino ou amido substitués ou non par alkyle éventuellement substitué ou interrompu par l'un des groupes précédents ; les groupes phényles, phénylènes et hétérocycliques pouvant être substitués par OH, Cl, Br, I, (C1-C8)alkyle, (C1-C8)alkyloxy, NO<sub>2</sub>, NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, NR<sub>x</sub>COR<sub>y</sub>, CONR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, COOR<sub>x</sub>, R<sub>x</sub> et R<sub>y</sub> étant H ou (C1-C8)alkyle, et les groupes alkyle, alkylène, alkoxy, en C1 à C14 linéaires, ramifiés ou cycliques pouvant être hydroxylés ;
  - R<sub>a</sub> à R<sub>i</sub> représentent indépendamment H, alkyle, hydroxyalkyle, alkylphényle, cycloalkyle.
  - U est un groupe -CXR<sub>4</sub>-lien 1, CHR<sub>4</sub>CON-lien1, CHR<sub>4</sub>-CHR<sub>5</sub>OH-lien1
  - R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> représentant indépendamment H, alkyle, hydroxyalkyle.
  - X ayant la signification ci-dessus.
  - Lien 1 étant un lien assurant le lien entre un chélate I<sub>a,b,c</sub> et un lien L lorsque q=0 et entre I<sub>a,b,c</sub> et D lorsque q=1

I<sub>d</sub>, I<sub>e</sub>, I<sub>f</sub> ayant les significations :



- X, R1, Ra à Ri ayant la même signification que ci-dessus.
- U' est lien 1 assurant le lien entre un chélate  $I_{d,e,f}$  et un lien L lorsque  $q=0$  et entre  $I_{d,e,f}$  et D lorsque  $q=1$ .

-  $I_g$  représentant



U,X,R1 ayant la même signification que ci-dessus, lien 1 assurant le lien entre un chélate  $I_g$  et un lien L lorsque  $q=0$  et entre  $I_g$  et D lorsque  $q=1$ .

b)

- $q = 0$  ou  $q=1$
- $r=1$  lorsque  $q=0$ , ou  $r$  compris entre 2 et 5 lorsque  $q=1$

15

c) D est une molécule polyfonctionnelle capable de relier un lien L à au moins deux chélates  $I_{a,b,c,d,e,f,g}$

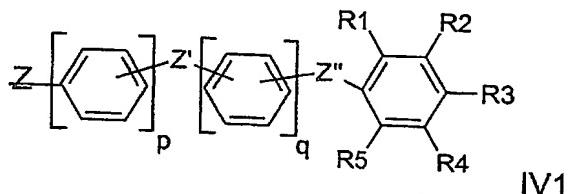
20

d) x, y et z sont compris entre 1 et 8, préférence x=1 à 3, y=1 à 6, z=1 à 3 sachant que  $y=z$  ;

ainsi que les sels des composés de formule (E) avec des acides ou des bases minérales ou organiques pharmaceutiquement acceptables.

2. Composé selon revendication 1, caractérisé en ce que R<sub>1</sub> est  $(CH_2)_xCONHR$  avec x=1, 2 ou 3 et R est un groupe hydrophile de poids moléculaire supérieur à 200, choisi parmi :

1) un groupement :



et Z est une liaison,  $CH_2$ ,  $CH_2CONH$  ou  $(CH_2)_2NHCO$

Z' est une liaison, O, S, NQ,  $CH_2$ , CO, CONQ, NQCO, NQ-CONQ ou CONQCH<sub>2</sub>CONQ,

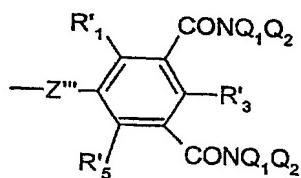
10 Z'' est une liaison, CONQ, NQCO ou CONQCH<sub>2</sub>CONQ

p et q sont des nombres entiers dont la somme vaut 0 à 3 ;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> ou R<sub>5</sub> représentent :

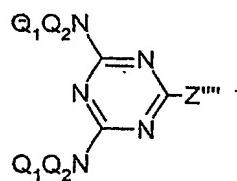
- 15 - soit indépendamment l'un de l'autre H, Br, Cl, I,  $CONQ_1Q_2$  ou  $NQ_1COQ_2$  avec Q<sub>1</sub> et Q<sub>2</sub> identiques ou différents sont H ou un groupe ( $C_1-C_8$ )alkyle mono- ou polyhydroxylé ou éventuellement interrompu par un ou des atomes d'oxygène, et au moins l'un et au plus deux des R<sub>1</sub> à R<sub>5</sub> sont  $CONQ_1Q_2$  ou  $NQ_1COQ_2$ ;

- soit R<sub>2</sub> et R<sub>4</sub> représentent



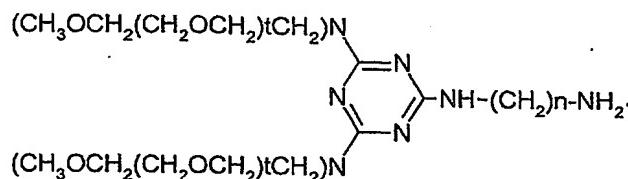
20 et R<sub>1</sub>, R'<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R'<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> et R'<sub>5</sub>, identiques ou différents, représentent H, Br, Cl ou I, Q<sub>1</sub> et Q<sub>2</sub> ont la même signification que précédemment et Z''' est un groupe choisi parmi CONQ, CONQCH<sub>2</sub>CONQ, CONQCH<sub>2</sub>, NQCONQ, CONQ(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NQCO et Q est H ou ( $C_1-C_4$ )alkyle, éventuellement hydroxylé, les groupes alkyle pouvant être linéaires ou ramifiés ;

25 2) une branches dite "flash"

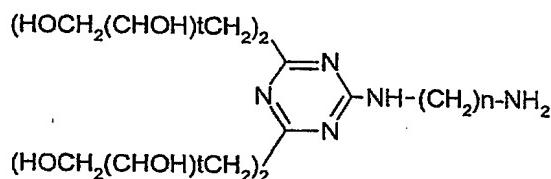


avec  $Z'''$  étant  $NQ(CH_2)^i(CH_2OCH_2)^j(CH_2)^lNH_2$ , avec  $i = 2$  à  $6$  et  $j = 1$  à  $6$ ,

de préférence



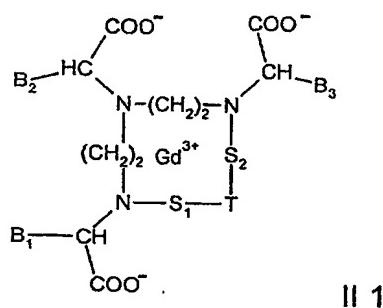
ou



avec  $t = 1, 2, 3$  ou  $4$  et  $n = 2$  à  $6$ .

10 3. Composé la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que  $q=1$ .

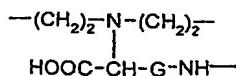
4. Composé la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que Ch FR représente le groupe :



dans lequel :

- $S_1-T-S_2-$  est

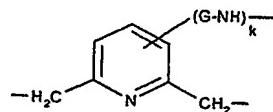
1) soit



où  $S_1 = S_2 = (\text{CH}_2)_2$

20 avec  $B_1, B_2, B_3$  représentant tous les trois  $(\text{CH}_2)_x\text{CONHR}$  avec  $x = 1, 2$  ou  $3$

2) soit

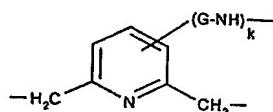


III1

avec  $k = 0$  et  $S_1 = S_2 = CH_2$

5 l'un des  $B_1, B_2, B_3$  représentant  $G-NH$ , et les autres représentant  $(CH_2)_xCONHR$

3) soit



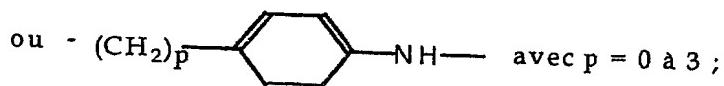
III1

avec  $k=1$

$B_1, B_2, B_3$  représentant tous les trois  $(CH_2)_xCONHR$  avec  $x = 1, 2$  ou  $3$

et  $GNH$  choisi parmi :

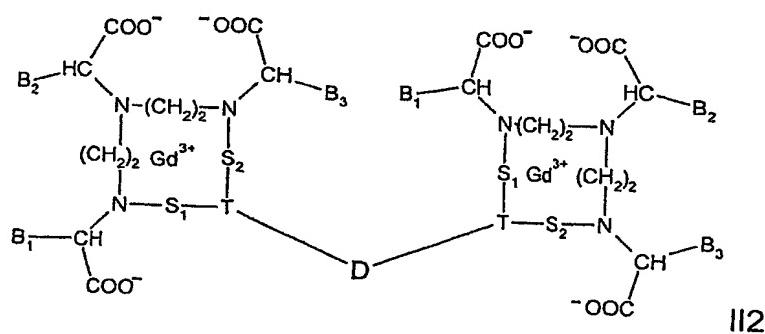
15 les groupes  $-(CH_2)_n-NH-$  avec  $n = 1$  à  $4$ ,



5. Composé selon la revendication 3, caractérisé en ce que Ch FR représente un groupe choisi parmi :

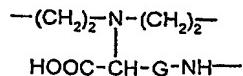
20

1) le groupe



dans lequel

$-S_1-T-S_2-$  est

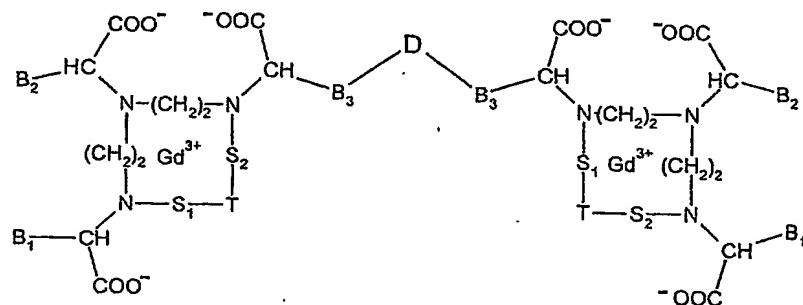


où  $S_1 = S_2 = (\text{CH}_2)_2$

$B_1, B_2, B_3$  représentant tous les trois  $(\text{CH}_2)_x\text{CONHR}$  avec  $x = 1, 2$  ou  $3$

5

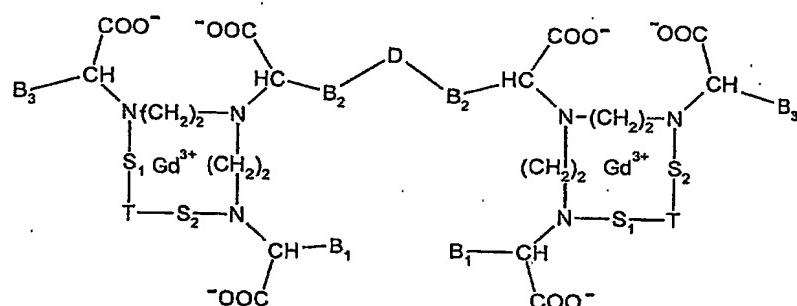
### 3) Le groupe



IIa2 (composé dit PCTA N fonctionnalisé)

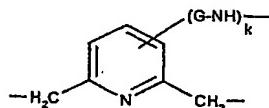
10

Ou IIb2 (composé dit PCTA N fonctionnalisé et isomère de position du IIa2)



II b2

Dans lesquels  $S_1\text{-}T\text{-}S_2\text{-}$  est :



III2

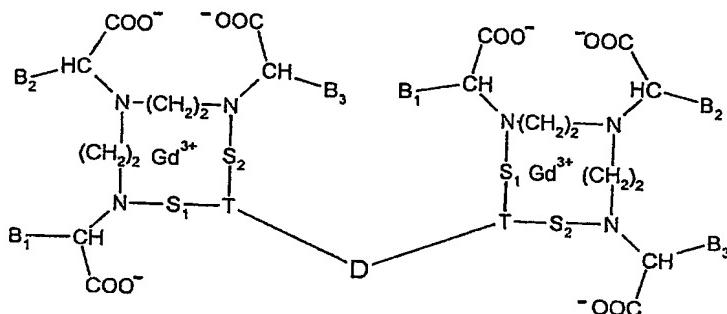
avec  $k = 0$  et  $S_1 = S_2 = \text{CH}_2$  ;

20

$B_3$  représentant  $\text{G-NH}$ , et  $B_1$  et  $B_2$  représentant  $(\text{CH}_2)_x\text{CONHR}$  pour IIa2

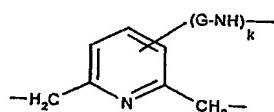
B<sub>2</sub> représentant G-NH, et B1 et B3 représentant (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CONHR pour II b2

3) le groupe



IIc2 (composé dit PCTA C fonctionnalisé)

lorsque S<sub>1</sub>-T-S<sub>2</sub>- est :



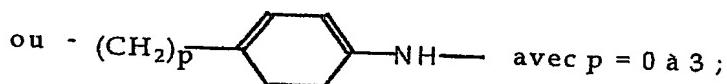
III<sub>2</sub>

avec k = 1 et S<sub>1</sub> = S<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub> ;

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> représentant tous les trois (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CONHR avec x = 1, 2 ou 3 pour IIc2

15 Sachant que, pour II2, IIa2, IIb2 et IIc2,

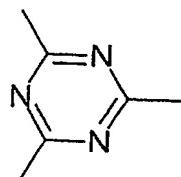
GNH est choisi parmi les groupes -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH- avec n = 1 à 4,



6. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que D

20 est un squelette aromatique polyfonctionnalisé par des groupements carboxylates et/ou aminés, D étant de préférence de type 1,3,5 triazine de formule :

lien2

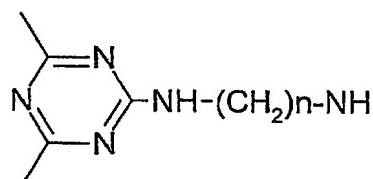


avec lien 2 choisi parmi a) et b) et de préférence a) :

- a)  $(CH_2)_2 - \phi - NH_2$ ,  $(CH_2)_3 - NH_2$ ,  $NH-(CH_2)_2-NH$ ,  $NH-(CH_2)_3-NH$ ,
- b) P1-I-P2, identiques ou différents, P1 et P2 étant choisis parmi OH, SH, NH2, rien, CO2H, NCS, NCO, SO3H,

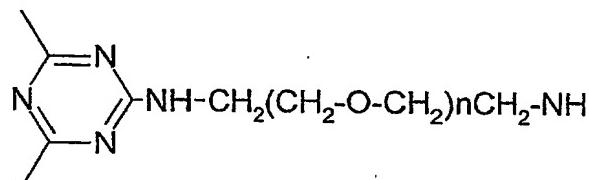
5 Avec I = Alkylène, alkoxyalkylène, polyalkoxyalkylène, alkylène interrompu par phénylène, alkylidène, alcilidène,

et D étant encore de préférence :



10

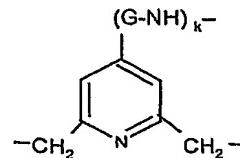
ou



7. Composé selon l'une quelconque des revendication 1 à 6; caractérisé en ce que L est un lien choisi parmi les polyoxoalkylènes, l'acide squarrique, un radical squarate-  
15 PEG, un alkylène, alkoxyalkylène, polyalkoxyalkylène, alkylène interrompu par phénylène, alkylidène, alcilidène.

8. Composé selon l'une quelconque des revendications 3 à 7 dans lequel x de  $(CH_2)_xCONHR$  est 2.  
20

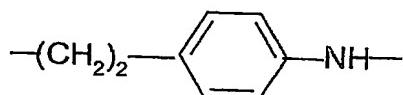
9. Composé selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, dans lequel  $-S_1 - T - S_2 -$  représente :



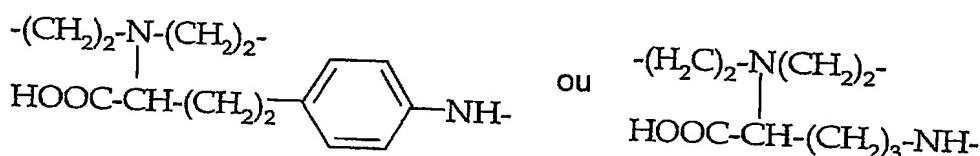
avec  $S_1 = S_2 = CH_2$ .

10. Composés selon la revendication 9 de formule I1 dans laquelle k est 1 et G est  $-(CH_2)_3-$ .

11. Composés selon la revendication 9 de formule I1 dans laquelle k est 0 et B<sub>2</sub> ou  
5 B<sub>3</sub> représente  $-(-CH_2)_3NH-$  ou



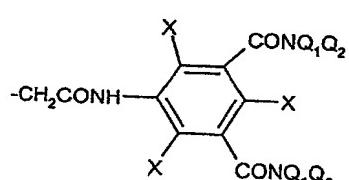
12. Composé selon l'une quelconque des revendications 4 à 9, dans lequel  $-S_1 - T - S_2-$  représente :



avec  $S_1 = S_2 = (CH_2)_2$ .

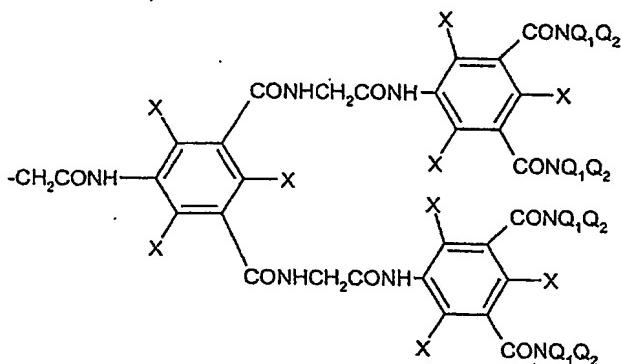
13. Composés selon l'une quelconque des revendications précédentes pour lesquels  
B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub>, lorsqu'ils ne représentent pas  $-G-NH$ , représentent  $-$   
15 (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONHR, avec dans R, p = q = 0 et Z étant  $-CH_2CONH$ .

14. Composés selon la revendication 13 pour lesquels R représente :



et les X sont identiques et représentent Br ou I tandis que Q<sub>1</sub> et Q<sub>2</sub>, identiques ou  
20 différents, sont des groupes (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alkyle, mono- ou polyhydroxylés, de telle sorte que  
chaque CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> comporte de 4 à 10 hydroxyles au total.

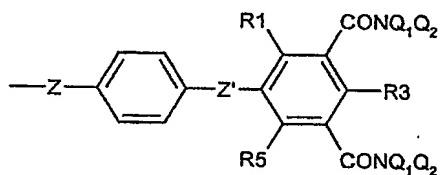
15. Composés selon la revendication 13 pour lesquels R représente :



et les X identiques sont Br ou I et Q<sub>1</sub> et Q<sub>2</sub>, identiques ou différents, sont des groupes (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alkyle, mono ou polyhydroxylés de telle sorte que chaque groupe CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> comporte de 4 à 10 hydroxyles au total.

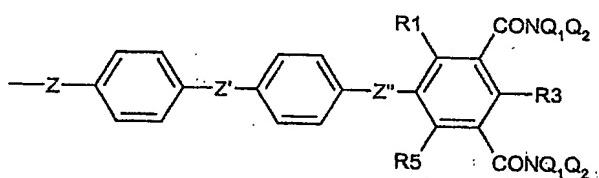
5

16. Composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour lesquels R représente :



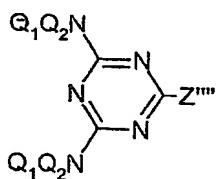
10 Z est CH<sub>2</sub> ou CH<sub>2</sub>CONH, Z' est CONH ou CONHCH<sub>2</sub>CONH, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, identiques, sont Br ou I, Q<sub>1</sub> et Q<sub>2</sub>, identiques ou différents, étant des groupes (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alkyle, mono ou polyhydroxylés, de telle sorte que chaque groupe CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> comporte de 4 à 10 hydroxyles au total.

15 17. Composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour lesquels R représente :



20 Z est CH<sub>2</sub>CONH, Z' est CONH, Z'' est CONHCH<sub>2</sub>CONH et R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> identiques sont Br ou I et Q<sub>1</sub> et Q<sub>2</sub>, identiques ou différents, sont des groupes (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alkyle, monohydroxylés ou polyhydroxylés, de telle sorte que chaque groupe CONQ<sub>1</sub>Q<sub>2</sub> comporte de 4 à 10 hydroxyles au total.

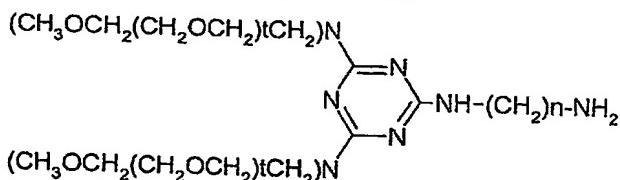
18. Composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour lesquels R représente



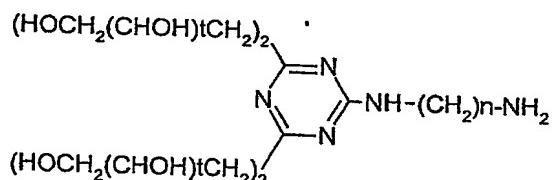
avec  $Z'''$  étant  $NQ(CH_2)_j(CH_2OCH_2)_i(CH_2)_jNH_2$ , avec  $i = 2$  à  $6$  et  $j = 1$  à  $6$ ,

5

de préférence R représente:



ou



10

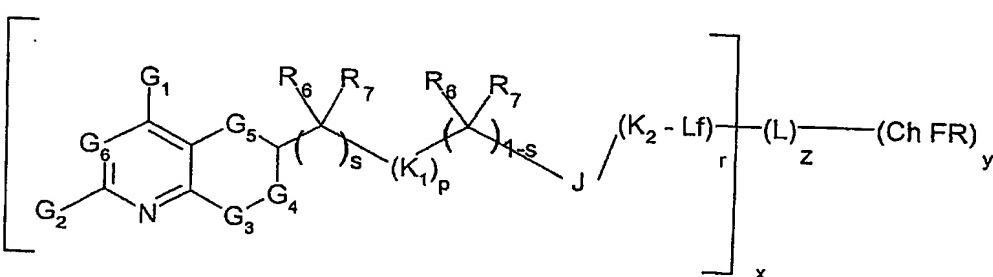
avec  $t = 1, 2, 3$  ou  $4$  et  $n = 2$  à  $6$ .

19. Composé selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que le biovecteur est un agent capable de cibler des récepteurs cellulaires ou des composants tissulaires, notamment choisis parmi les récepteurs des cellules myocardiques, des cellules

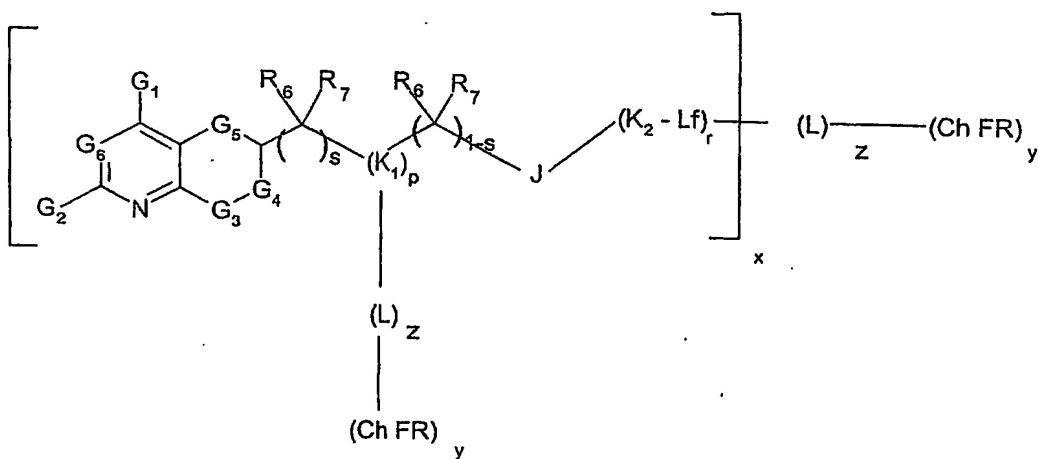
15 endothéliales, des cellules épithéliales, des cellules tumorales, des cellules du système immunitaire.

immunitaire.

20. Composé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que le biovecteur est un agent capable de cibler un récepteur au folate, (E) s'écrivant :



ou (E2) :



avec :

- a) G<sub>1</sub> est choisi indépendamment dans le groupe constitué par : halo, R<sub>f</sub>2, O R<sub>f</sub>2, S R<sub>f</sub>3, N R<sub>f</sub>4 R<sub>f</sub>5 ;
- b) G<sub>2</sub> est choisi indépendamment dans le groupe constitué par : halo, R<sub>f</sub>2, O R<sub>f</sub>2, S R<sub>f</sub>3, et N R<sub>f</sub>4 R<sub>f</sub>5 ;
- c) G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> représentent des groupes divalents choisis indépendamment dans le groupe constitué par -(R<sub>f</sub>6') C=, -N=, -(R<sub>f</sub>6') C (R<sub>f</sub>7')-, -N (R<sub>f</sub>4')- ;
- d) G<sub>5</sub> est absent ou choisi parmi -(R<sub>f</sub>6') C=, -N=, -(R<sub>f</sub>6') C (R<sub>f</sub>7')-, -N (R<sub>f</sub>4')- ;
- e) Le cycle J est un cycle aromatique hétérocyclique ou non à 5 ou 6 sommets, les atomes du cycle pouvant être C, N, O, S ;
- f) G<sub>6</sub> est N ou C
- g) K<sub>1</sub> et K<sub>2</sub> sont choisis indépendamment dans le groupe constitué par -C (Z<sub>f</sub>)-, -C (Z<sub>f</sub>) O-, -OC (Z<sub>f</sub>)-, -N (R<sub>f</sub>4")-, -C (Z<sub>f</sub>)-N (R<sub>f</sub>4"), -N (R<sub>f</sub>4")-C (Z<sub>f</sub>), -O-C(Z)-N(R<sub>f</sub>4")-, -N(R<sub>f</sub>4")-C(Z<sub>f</sub>)-O-, N(R<sub>f</sub>4")-C(Z<sub>f</sub>)-N(R<sub>f</sub>5")-, -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)2-, -N(R<sub>f</sub>4")S(O)2-, -C(R<sub>f</sub>6") (R<sub>f</sub>7")-, -N(C ≡ CH)-, -N(CH<sub>2</sub>-C ≡ CH)-, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkyle et C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkoxy; dans lequel Z<sub>f</sub> est O ou S ; de préférence K<sub>1</sub> est -N(R<sub>f</sub>4")- ou -C(R<sub>f</sub>6") (R<sub>f</sub>7")- avec R<sub>f</sub>4", R<sub>f</sub>6", R<sub>f</sub>7" étant H ; K<sub>2</sub> étant ou non lié de manière covalente à un acide aminé ;
- h) R<sub>f</sub>1 est choisi dans le groupe constitué par : H, halo, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkyl, et C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkoxy ; R<sub>f</sub>2, R<sub>f</sub>3, R<sub>f</sub>4, R<sub>f</sub>4', R<sub>f</sub>4", R<sub>f</sub>5, R<sub>f</sub>5", R<sub>f</sub>6" et R<sub>f</sub>7" sont choisis indépendamment dans le groupe constitué par : H, halo, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkyle, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkoxy, C,-C, 2 alkanoyle, C,-C, 2 alcényle, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alcynyle, (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkoxy)carbonyle, and (C,-C, 2 alkylamino) carbonyle;
- i) R<sub>f</sub>6 et R<sub>f</sub>7 sont choisis indépendamment dans le groupe constitué par : H, halo, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkyle, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkoxy ; ou R<sub>f</sub>6 et R<sub>f</sub>7 forment ensemble O= ;

- j) R<sub>f</sub>6' et R<sub>f</sub>7' sont choisis indépendamment dans le groupe constitué par : H, halo, C1-C12 alkyle, C1-C12 alkoxy ; ou R<sub>f</sub>6' et R<sub>f</sub>7' forment ensemble O= ;  
 k) L<sub>f</sub> est un lien divalent incluant le cas échéant un acide aminé naturel ou un poly acide aminé naturel, cet acide ou polyacide étant lié à K2 ou à K1 par son groupement alpha-amino par une liaison amide ;  
 5 l) n, p, r et s sont indépendamment 0 ou 1.

21. Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que G1 est NH<sub>2</sub> ou OH.

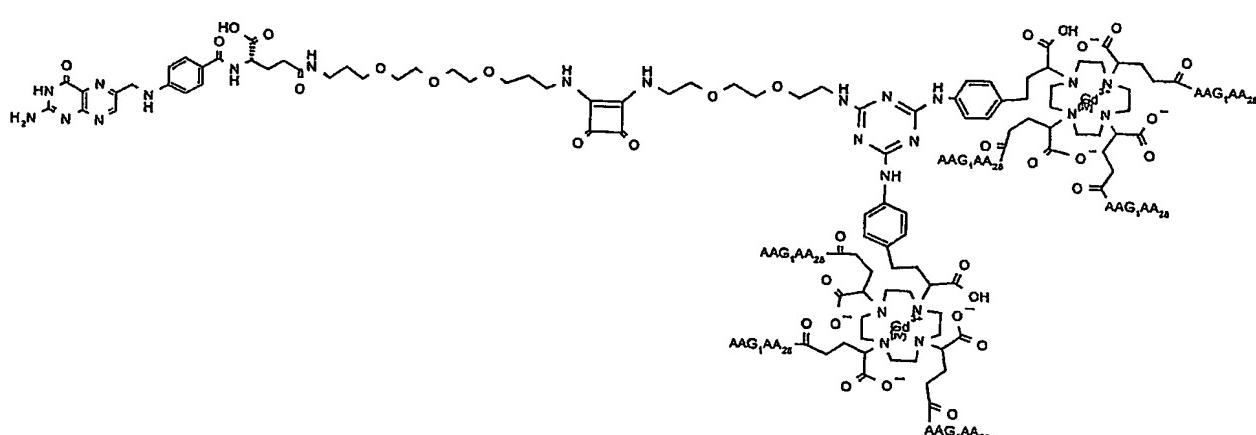
10 22. Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que G3 est -N= ou -CH- lorsque le cycle comprenant G3 est aromatique, et G3 est -NH- ou -CH<sub>2</sub>- lorsque le cycle comprenant G3 est non aromatique ; avec de préférence G3 étant -CH-, G1 étant OH, G6 étant NH, K1 étant -N(R<sub>f</sub>4")-.

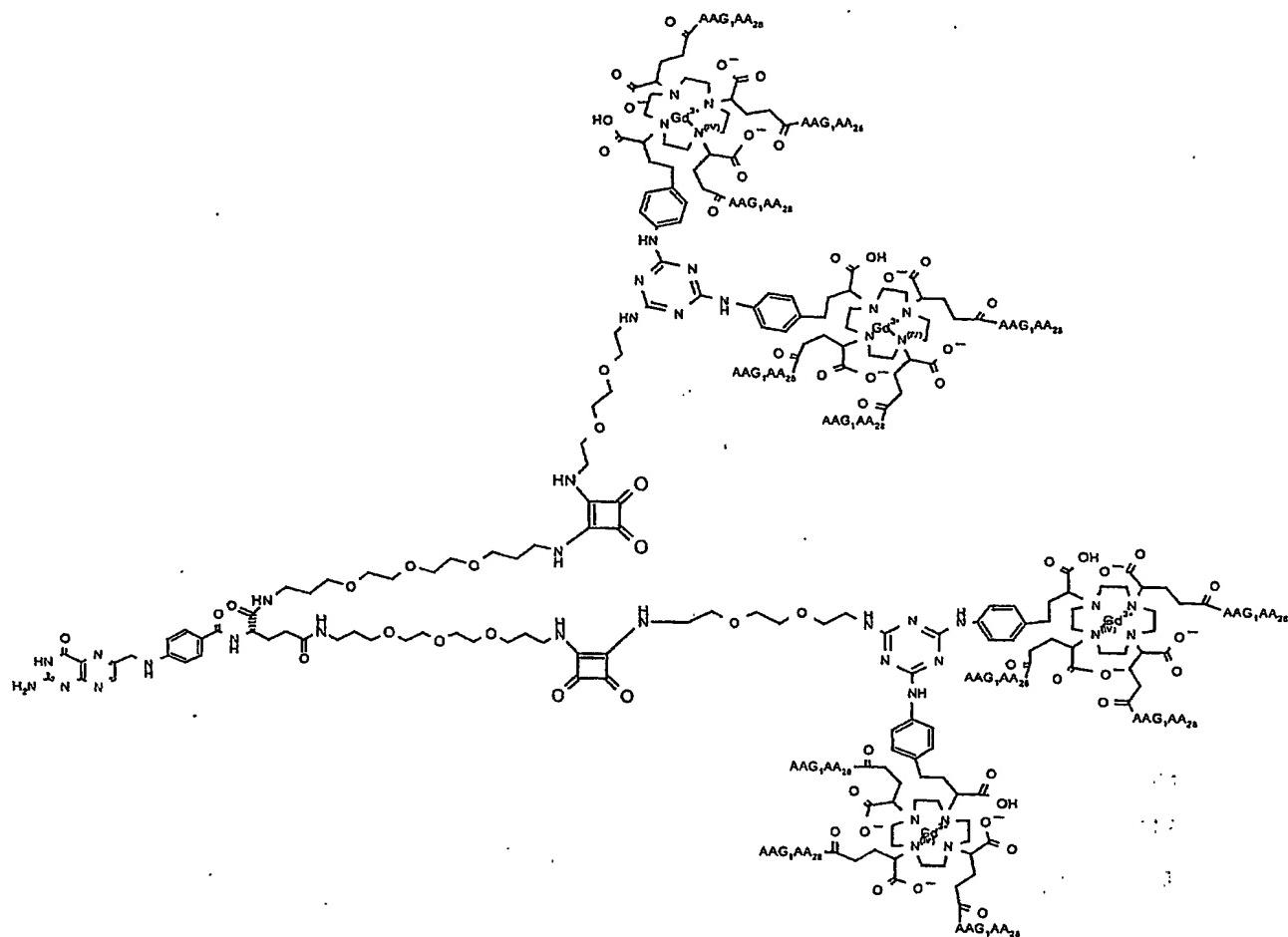
15 23. Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que G4 est -CH- ou -C(CH<sub>3</sub>)- lorsque le cycle comprenant G3 est aromatique, et -CH<sub>2</sub>- ou -CH(CH<sub>3</sub>)- lorsque le cycle comprenant G3 est non aromatique.

20 24. Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que G5 est absent, avec de préférence G1 étant OH, G2 étant NH<sub>2</sub>, G6 étant N.

25. Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que G6 est N ou C.

26. Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que (E) est

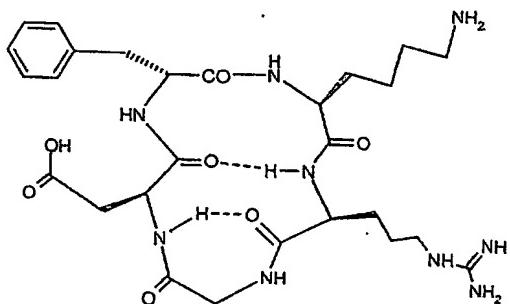




27. Composé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que le biovecteur est un inhibiteur d'angiogenèse.
- 5
28. Composé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que le biovecteur est un agent capable d'inhiber l'activité d'une MMP
- 10
29. Composé selon la revendication 28, caractérisé en ce que biovecteur est un inhibiteur de MMP dérivé de l'ilomastat .
30. Composé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que le biovecteur est un agent capable de cibler une intégrine.
- 15
31. Composé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le biovecteur est un agent capable de cibler l'intégrine  $\alpha\beta 3$ , notamment un peptide RGD, un

peptidomimétique du peptide RGD, un agent non peptidique capable de mimer l'action d'un peptide RGD.

5 32. Composé selon la revendication 31, caractérisé en ce que le biovecteur est un peptide RGDFV de structure :



10 33. Composé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le biovecteur est un agent capable de cibler l'intégrine GPIIb/IIIa.

34. Composé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le biovecteur est un agent capable de cibler une vitronectine.

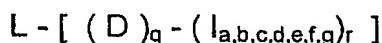
15 35. Composé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que biovecteur est un agent capable de cibler un récepteur angiogénique de cellules endothéliales, notamment un récepteur VEGFR, de préférence un peptide ATWLPPR, HTMYYHHYQHHL.

20 36. Composé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que biovecteur est un agent capable de cibler des récepteurs localisés sur les macrophages, notamment des récepteurs SRA.

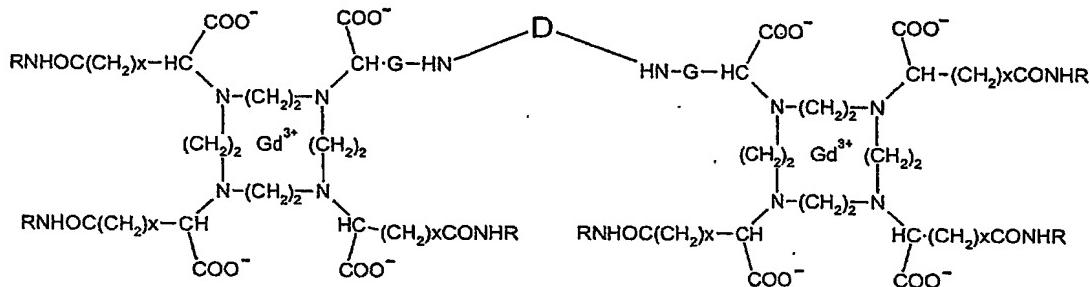
25 37. Composé selon la revendication 36, caractérisé en ce que biovecteur est un dérivé de la Phosphatydilsérine.

38. Composé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que biovecteur est un dérivé bisphosphonate.

39. Composé intermédiaire, utilisé pour la préparation d'un composé selon la revendication 1, de formule :

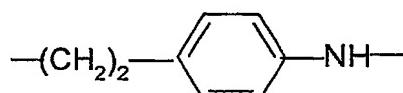


Avec L de préférence de type squarate, q=1 et  $[ (D)_q - (I_{a,b,c,d,e,f,g})_r ]$  étant de 5 préférence choisi parmi :

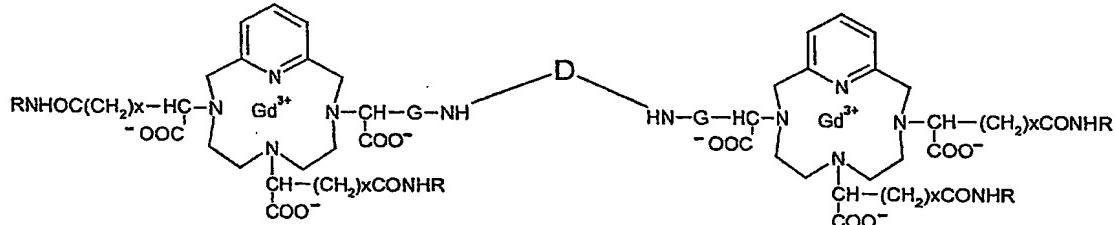


II' 2

avec -G-NH étant  $-(CH_2)_3-NH-$  ou



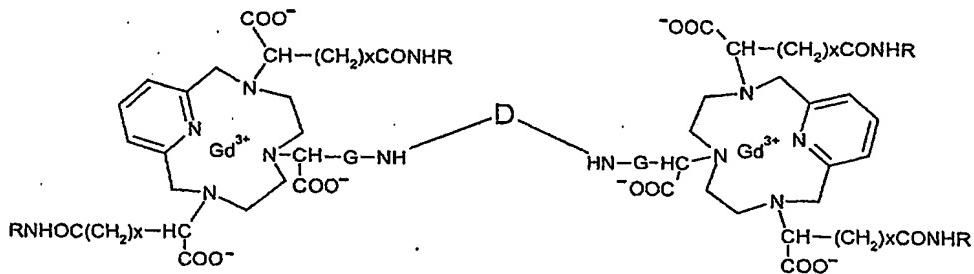
2)



10

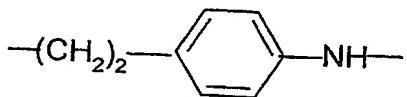
II" a2

3) II" b2

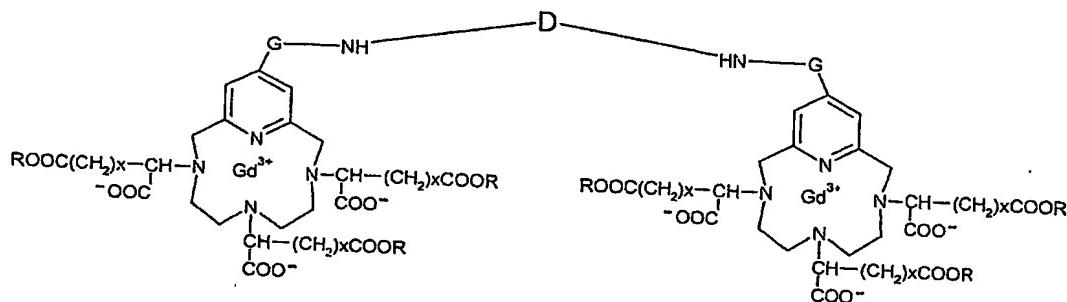


15

avec -G-NH étant  $-(CH_2)_3-NH-$  ou



4)



II " 2

Avec G-NH étant  $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_-$ 

40. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 38, sous sa forme liée à un élément M, (E) s'écrivant  $\text{B}_x - \text{L} - (\text{Ch FR})_y - \text{M}$ ; sachant que M est soit un ion de métal paramagnétique de numéro atomique 21-29, 42-44, ou 58-70, soit un radionucléide, typiquement choisi parmi  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{117}\text{Sn}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ;  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{149}\text{Pr}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ , soit un ion de métal lourd de numéro atomique 21-31, 39-49, 50, 56-80, 82, 83, 90.

15 41. Produit de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique, caractérisé en ce qu'il comprend un composé selon l'une des revendications 1 à 38, éventuellement associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20 42. Produit de contraste selon la revendication 41, présenté sous forme d'une solution stérile injectable.

43. Composé selon l'une quelconque des revendications 41 ou 42 pour son utilisation dans le diagnostic d'une pathologie cardiovasculaire, cancéreuse, inflammatoire.

44. Produit de médecine nucléaire caractérisé en ce qu'il comprend un composé selon l'une des revendications 1 à 38, éventuellement associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

5 45. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 22, ayant une relaxivité comprise entre 25 et 200 mM<sup>-1</sup>Gd<sup>-1</sup>.

10 46. Procédé de préparation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 38 caractérisé en ce qu'il comprend le couplage d'au moins un biovecteur et d'au moins un chélate à forte relaxivité tel que défini dans l'une des revendications 1 à 18.

PCT/IB2004/002193



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**